



TESIS DE DOCTORADO

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS LIGANDOS DIRIGIDOS A LA INTERLEUQUINA 17 CON UTILIDAD FARMACOLÓGICA EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Elia Álvarez Coiradas

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2020





DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS

Identificación de nuevos ligandos dirigidos a la interleuquina 17 con utilidad farmacológica en enfermedades autoinmunes

Dña. Elia Álvarez Coiradas

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela, 2 de septiembre de 2020

Fdo

Elia Álvarez Coiradas





AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Identificación de nuevos ligandos dirigidos a la interleuquina 17 con utilidad farmacológica en enfermedades autoinmunes

D. Eduardo Domínguez Medina

Dña María Isabel Loza García

INFORMAN:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. Elia Álvarez Coiradas, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 2 de septiembre de 2020

Fdo

Eduardo Domínguez Medina

Fdo

María Isabel Loza García

Financiación

La presente tesis doctoral ha contado con la financiación otorgada por la Xunta de Galicia (ED431C 2018/21 y ED431C 2018/49) y Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

La autora ha sido beneficiaria de una ayuda del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU 2015) concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.



AGRADECIMIENTOS

El horizonte que tienes por delante cuando empiezas la tesis parece inalcanzable. Ahora, en 2020, después de años de trabajo en el laboratorio que podría sintetizar como “pipetas y *papers*”, y largas horas de escritura pre-confinamiento y en-confinamiento, ha llegado el momento de cerrar. Creo que no hay ningún cierre mejor que el agradecimiento a todas las personas que habéis pasado por mi vida durante este tiempo y habéis contribuido a que esta tesis llegara a su fin.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis, Mabel Loza y Eduardo Domínguez. Mabel, gracias por darme la oportunidad de formar parte de este grupo y guiarme para poder terminar esta tesis. Edu, gracias por estar ahí desde el principio, por tus consejos científicos y personales, por tu optimismo y por tu calma canaria. Por esas conversaciones que se nos alargan por derroteros alternativos, por ayudarme en las *mini-crisis* y apoyarme siempre. Esta tesis también es tuya.

Por supuesto, agradecer a Kilian Huber la oportunidad de desarrollar parte de este trabajo en la Universidad de Oxford. A Laura, mi guía personal y profesional allí. Gracias a Cristian Munteanu por su colaboración para desarrollar los resultados virtuales de este trabajo y las figuras de *docking*.

Gracias a todas y todos los que formáis o habéis formado parte del grupo Biofarma. Cada persona que ha coincidido conmigo ha aportado algo a este trabajo. Gracias por los “tira con todo” que te sacan una sonrisa cuando quieres cumplir esa frase literalmente (especialmente los de Silvia y Lage, que me llevan acompañando desde el principio de los tiempos).

No podría haber tenido más suerte con vosotros, Odiosos. Os encontré en medio de un laboratorio lleno y ahora puedo decir que sois mis amigas y amigos. Gracias por acogerme. Por todos los

Comida-comer y las conversaciones que los acompañan, eventos, festivales, cines, excursiones y viajes. Porque nada es *Aladdin* si estáis vosotros, incluso cuando estamos *cadaleitos*.

Cómo olvidar los primeros consejos cuando empecé la tesis. Álex, Ailim, Alba, me guiasteis por la ciencia y me enseñasteis lo importante que es tener personas que te apoyen en este camino. Patri, gracias por los *comments*, por tu alegría y tus tours por London. Lauriña, gracias por ser tan acogedora, por tus visitas y por las odiositas en Canarias. Óscar, gracias por tu generosidad, por apoyarme y prestarme los tornillos que me faltan (*Mactornillos*). Luci, gracias por tu energía, tu compañerismo fuera y dentro del laboratorio, en *Conxoland* o en la sala de cultivos (por ahora el trébol sigue feliz). David, gracias por enseñarme a hacer *Western blots*, supongo que también por los “debates” infinitos, aunque eso ya no lo tengo tan claro (para un poco con los libros y léete este).

Gracias a las gallinas viejas, por nuestras realidades paralelas. Porque nunca sabes cuándo puede surgir una. Y, evidentemente, por vuestro apoyo y vuestra amistad. Ampe, gracias por tus grandes consejos. Por ese vocabulario tan expresivo que hemos adoptado. Carlis, gracias por todas las carcajadas que provocas. Cris, gracias por todos los cafelines compartidos.

Por supuesto, gracias a las ocas (locas), porque esta tesis, las alegrías y *dramelias* también son vuestras. Andrea, gracias por estar ahí desde el principio, por guiarme y por comprender mis crisis existenciales. Marti, Gemelier, gracias por compartir este viaje que es la tesis (y por los viajes menos metafóricos). Lo hemos vivido paralelamente y no puedo dejar de agradecerlo, porque no se me ocurre una mejor compañera. Lauris, gracias por tu vitalidad, por nuestros *fakes* científicos y por quedarte en Galicia, porque nada habría sido lo mismo. Marcos, gracias por permitirme compartir el ser *hater*, es tremendamente liberador.

Porque acabar farmacia juntas e intentar encontrar un camino más allá no es tarea fácil, Carla, Sandra. Gracias por apoyarme y por esas sesiones de actualización. Y a los doctorandos “co-existentes”

del CiMUS, María, Lidia, Alberto, gracias por entenderme. Gracias, Plaquetas, por dejarme usar vuestro gran escáner y preocuparos por el avance de este trabajo. Gracias, Elena, porque fuiste mi pollito y ahora vuelas sola con tu propia tesis.

Gracias a mis amigos históricos, porque dos décadas de amistad no se pueden definir de otra manera. Por estar siempre ahí, a veces con unos cientos (o miles) de kilómetros de distancia física, pero nada que no pueda solucionar una reunión compostelana (u oxoniense o menorquina) en de vez en cuando. O, en este 2020, unas reuniones virtuales en plena pandemia. Por compartir dramas y crisis existenciales, por intentar entender “de qué va mi tesis” y porque sé que queréis lo mejor para mí, igual que yo lo quiero para vosotras. Gracias, Luis, Carmen, Sara y Áurea.

Gracias a mis “segundas” familias, porque os preocupáis por mí y porque me apoyáis a un nivel que no sé si puedo agradecer. A Ángeles, Andrés, Anxo y Manu. A Isa, José, Elia y Aroa.

A Iván, por apoyarme, por cuidarme y por quererme. Y, sobre todo, por seguir haciéndolo a pesar de haber pasado una cuarentena con la “Elia” que está terminando sus tesis.

Por último, a mi familia. A Heri, María y José. Y en especial a nuestro pequeño “núcleo”. Porque si he llegado hasta aquí es gracias a vosotros. Por quererme y por vuestra paciencia desde el principio hasta el final. Creo que no existen palabras suficientes para expresar todo lo que os debo. Esta tesis no existiría sin vosotros. Gracias, mamá, papá y Haidé.





ÍNDICE



Abreviaturas, siglas y símbolos	23
Resumen.....	31
Abstract	33
INTRODUCCIÓN.....	37
1. Fisiopatología de las citoquinas. La interleuquina 17	37
1.1. Las citoquinas participan en la regulación el sistema inmunitario.....	37
1.2. La familia de la interleuquina 17 y sus receptores en la respuesta inmunitaria	41
1.3. Células del sistema inmunitario productoras de la interleuquina 17	44
1.4. Mecanismos de señalización del receptor de IL-17A.....	45
1.4.1. Vía de señalización de NF- κ B.....	48
1.4.2. Vía de las MAPK, C/EBP β y C/EBP δ	48
1.4.3. Señalización postranscripcional	49
1.4.4. Mecanismos de regulación negativa	49
2. Las funciones biológicas y patológicas de la interleuquina 17	50
2.1. El papel fisiológico de IL-17. Actividad inflamatoria	50
2.2. La actividad inflamatoria de IL-17: sinergias.....	51
2.3. La actividad de las otras citoquinas de la familia de IL-17: IL-17B a F.	52
2.4. El papel de IL-17 en las patologías relacionadas con el sistema inmunitario.....	53
2.4.1. IL-17 en las enfermedades reumáticas autoinmunes.....	53
2.4.2. IL-17 en la esclerosis múltiple	54
2.4.3. IL-17 en la enfermedad inflamatoria intestinal.....	54
2.4.4. IL-17 en la dermatitis atópica	54
2.4.5. IL-17 en el cáncer	55
2.5. Psoriasis	55

2.5.1. Patogénesis de la psoriasis. El papel de IL-17	58
3. Terapias dirigidas a la interlequina 17 para las enfermedades autoinmunes	61
3.1. IL-17 como diana terapéutica	62
3.2. IL-23 como diana terapéutica	63
3.3. ROR γ t como diana terapéutica	66
3.4. Terapias dirigidas a la vía de IL-17 en la psoriasis	67
3.5. Terapias dirigidas a la vía de IL-17 en otras patologías	70
3.5.1. Artritis psoriásica	70
3.5.2. Espondilitis anquilosante	71
3.5.3. Artritis reumatoide	72
3.5.4. Esclerosis múltiple	73
3.5.5. Enfermedad inflamatoria intestinal	73
3.6. Efectos adversos de las terapias dirigidas a la vía de IL-17	74
4. Moléculas pequeñas terapéuticas dirigidas a las interacciones proteína-proteína	75
4.1. La necesidad de moléculas pequeñas	75
4.2. Los retos en la identificación de moléculas pequeñas para las interacciones proteína-proteína	77
4.3. La interacción proteína-proteína entre IL-17A e IL-17RA como diana terapéutica	81
Antecedentes	87
Hipótesis	89
Objetivos	89
MATERIAL Y MÉTODOS	93
1. Material	93
1.1. Reactivos y tampones	93
1.1.1. Material empleado en el cultivo de líneas celulares	93

1.1.2. Material empleado en la expresión de proteínas recombinantes humanas.....	94
1.1.3. Material empleado en la técnica de Western blot.....	95
1.1.4. Material empleado en ensayos biofísicos	96
1.1.5. Material empleado en inmunoensayos de citoquinas	97
1.1.6. Material empleado en ensayos de microscopía.....	98
1.1.7. Material empleado en ensayos expresión genética de proteínas	98
1.2. Equipos.....	99
MÉTODOS.....	100
2. Cultivo de líneas celulares	100
2.1. Línea celular HEK 293	100
2.2. Línea celular HT-29	101
2.3. Línea celular HaCaT.....	101
2.4. Descongelación celular	101
2.5. Expansión celular	102
2.6. Criopreservación celular	102
2.7. Siembra celular en placas multipocillo	103
3. Expresión de la proteína humana recombinante interleuquina 17A	103
3.1. Clonaje de la secuencia de la interleuquina 17A en un plásmido de expresión en células eucariotas.....	103
3.2. Transformación de bacterias DH5 α con el plásmido pcDNA3.1+C-6His-IL-17A.....	105
3.3. Cultivo en suspensión de bacterias para producir el ADN recombinante pcDNA3.1+C-6His-IL-17A.....	105
3.4. Purificación del plásmido pcDNA3.1+C-6His-IL-17A.....	106
3.5. Transfección del plásmido pcDNA3.1+C-6His-IL-17A y expresión de la proteína IL-17A humana recombinante en células HEK 293	107

3.6. Purificación de IL-17A humana recombinante	107
3.7. Validación de la expresión de la proteína IL-17A-His mediante Western blot	108
4. Identificación de ligandos de IL-17A/IL-17RA mediante cribado virtual.....	109
5. Ensayo <i>label-free</i> de redistribución dinámica de masas (DMR)....	113
5.1. Fundamento de la tecnología de redistribución dinámica de masas	113
5.2. Desarrollo de un ensayo de unión a IL-17RA ECD basado en la tecnología de redistribución dinámica de masas.....	116
5.3. Determinación de la unión de ligandos identificados por cribado virtual al receptor IL-17RA mediante redistribución dinámica de masas	117
5.4. Análisis estadístico y procesamiento de datos de unión obtenidos mediante DMR	118
6. Ensayo biofísico de resonancia de plasmones superficiales (SPR)	121
6.1. Fundamento de la tecnología de resonancia de plasmones superficiales.....	121
6.2. Evaluación de la interacción de los ligandos con IL-17RA mediante resonancia de plasmones superficiales	123
6.3. Análisis y procesamiento de datos de SPR.....	124
7. Determinación de la liberación de citoquinas mediante inmunoensayos Luminex®	125
7.1. La tecnología Luminex® para la determinación de citoquinas con inmunoensayos multiplexados.....	125
7.2. Desarrollo de un ensayo de liberación de quimioquinas inflamatorias en células tumorales de colon	126

7.3. Evaluación de la actividad inhibitoria de los ligandos de IL-17A/IL-17RA en un ensayo de liberación de CXCL1 en la línea celular HT-29	128
7.4. Desarrollo de un ensayo de liberación de quimioquinas inflamatorias en queratinocitos humanos	129
7.5. Evaluación de la actividad inhibitoria de los ligandos en un ensayo de liberación de IL-8 y CCL20 en la línea celular HaCaT	130
7.6. Análisis y procesamiento de datos de liberación de quimioquinas mediante Luminex®	131
8. Los queratinocitos HaCaT Como modelo <i>in vitro</i> de piel.....	132
9. Análisis de expresión de quimioquinas y proteínas de la cascada inflamatoria de IL-17RA.....	134
9.1. Expresión genética de quimioquinas y proteínas de la cascada inflamatoria de IL-17RA mediante Taqman®	134
9.2. Estimulación de vías inflamatorias, obtención de lisados y aislamiento y purificación de ARN	137
9.3. RT-qPCR de CCL20 y CXCL8, CEBPB y ZC3H12A.....	138
9.4. Análisis y procesamiento de los datos de expresión génica ..	140
10. Efecto de los ligandos de IL-17A/IL-17RA sobre la señalización inflamatoria intracelular en queratinocitos humanos	141
10.1. Activación e inhibición de la inflamación de la señalización intracelular y preparación de lisados de queratinocitos humanos..	141
10.2. Determinación de NF- κ B p65 e I κ B α totales y fosforiladas mediante estudios de Western blot	142
10.3. Análisis y procesamiento de datos de expresión mediante Western blot	143
RESULTADOS	147
1. Identificación de ligandos mediante estudios de unión <i>in silico</i> ..	147

2. Caracterización farmacológica de la unión de los ligandos a IL-17A/IL-17RA mediante métodos biofísicos.....	149
2.1. Obtención del reactivo biológico necesario para la realización de ensayos biofísicos.....	149
2.2. Desarrollo de un ensayo de redistribución dinámica de masas (DMR).....	150
2.3. Priorización de los ligandos mediante un ensayo de redistribución dinámica de masas	153
2.4. Caracterización de la actividad farmacológica de los <i>hits</i> mediante DMR	155
2.5. Determinación de la actividad farmacológica de los ligandos mediante un ensayo de resonancia de plasmones superficiales.....	157
3. Modelo de interacción estructural entre los ligandos e IL-17A/IL-17RA	159
4. Evaluación farmacológica de los ligandos sobre la liberación de quimioquinas mediada por IL-17.....	169
4.1. Desarrollo de un ensayo de liberación de quimioquinas proinflamatorias en células tumorales de colon.....	169
4.2. Evaluación de la actividad farmacológica de los ligandos sobre la liberación de CXCL1 mediada por IL-17A en células tumorales de colon	171
4.3. Las células HaCaT pueden utilizarse como un modelo de piel <i>in vitro</i>	173
4.4. Desarrollo de un ensayo de liberación de quimioquinas proinflamatorias en queratinocitos humanos	175
4.5. Evaluación de la actividad inhibitoria de los ligandos sobre la liberación de CCL20 mediada por IL-17A en queratinocitos humanos	179

4.6. Evaluación de la actividad inhibitoria de los ligandos sobre la liberación de IL-8 mediada por IL-17A en queratinocitos humanos	180
4.7. Evaluación de la selectividad de los ligandos sobre la inhibición de la liberación de IL-8 y CCL20 en queratinocitos humanos.....	182
5. Evaluación de la actividad farmacológica de los ligandos sobre la expresión de quimioquinas proinflamatorias	184
5.1. Desarrollo de un ensayo de expresión de quimioquinas inflamatorias en queratinocitos humanos	184
5.2. Evaluación de la actividad inhibitoria de los ligandos sobre la expresión de <i>CCL20</i> y <i>CXCL8</i> mediada por IL-17A en queratinocitos humanos.....	186
6. Efecto de los ligandos sobre la señalización inflamatoria de IL-17 en queratinocitos humanos	187
6.1. Evaluación de la actividad de los ligandos sobre la señalización de NF- κ B p65 mediada por IL-17A	187
6.2. Evaluación de la actividad de los ligandos sobre la señalización de I κ B α mediada por IL-17A.....	189
6.3. Desarrollo de un ensayo de expresión de <i>CEBPB</i> y <i>ZC3H12A</i> en queratinocitos humanos.....	190
6.4. Evaluación de la actividad de los ligandos sobre la señalización de C/EBP β mediada por IL-17A	192
6.5. Evaluación de la actividad de los ligandos sobre la señalización de Regnasa-1 mediada por IL-17A.....	193
DISCUSIÓN	197
Conclusiones.....	223
Conclusions	225
Referencias bibliográficas	229





ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS



ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

Å	Ángstrom
ACR	American College of Rheumatology
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Energía de afinidad <i>Affinity energy</i>
AMP	Péptido antimicrobiano <i>Antimicrobial peptide</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ASAS	Assessment of Spondyloarthritis International Society
B _{máx}	Número máximo de sitios de unión <i>Maximum number of binding sites</i>
BSA	Albúmina de suero bovino <i>Bovine serum albumin</i>
C	Grado Celsius
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
CCL	Ligando de quimioquina (motivo C-C) <i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMV	Citomegalovirus
C _T	Ciclo de PCR en el que se supera el valor umbral
CV	Coeficiente de variación
CXCL	Ligando de quimioquina (motivo C-X-C) <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
Da	Dalton
DAS	Disease Activity Score

DEL	Quimiotecas codificadas por ADN <i>DNA-encoded libraries</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMR	Redistribución dinámica de masa <i>Dynamic mass redistribution</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DS	Desviación estándar
ECD	Dominio extracelular <i>Extracellular domain</i>
EDC	Hidrocloreuro de <i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
EMA	European Medicines Agency
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAM	Amidita de fluoresceína
FBS	Suero fetal bovino <i>Fetal bovine serum</i>
Fc	Fragmento cristizable
FDA	Food and Drug Administration
g	Unidad relativa de medida de la aceleración igual a la aceleración de la gravedad
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HDX-MS	Espectrometría de masas de intercambio hidrógeno-deuterio <i>Hydrogen-deuterium exchange mass spectroscopy</i>
HEK 293	Células embrionarias de riñón humano <i>Human embryonic kidney cells</i>

HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinaetansulfónico
HPR	Peroxidasa de rábano <i>Horseradish peroxidase</i>
HTS	Cribado de alto rendimiento <i>High throughput screening</i>
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IL-17R	Receptor de la interleuquina 17
ILC	Célula linfoide innata <i>Innate lymphoid cell</i>
INF-γ	Interferón-gamma
IκBα	Inhibidor del factor nucleor potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, alfa <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K_D	Constante de disociación en el equilibrio
LB	Luria-Bertani
M	Molaridad
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MFI	Mediana de la intensidad de fluorescencia <i>Median Fluorescence Intensity</i>
MGB	Minor Groove Binder
MMP	Metaloproteinasas de la matriz <i>Matrix metalloproteinases</i>
NF-κB	Factor nucleor potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Célula <i>natural killer</i>

NKT	Células T <i>natural killer</i>
NMR	Resonancia magnética nuclear <i>Nuclear magnetic resonance</i>
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida <i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PASI	Psoriasis Area and Severity Index
PBD	Protein Data Bank
PBS	Tampón fosfato salino <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa <i>Polimerase chain reaction</i>
PE	Ficoeritrina <i>Phycoerythrin</i>
PEI	Polietilenimina
PFA	Paraformaldehido
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonio
RIPA	Ensayo de radioinmunoprecipitación <i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RORγ	Receptor huérfano gamma relacionado con RAR (receptor de ácido retinoico) <i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
ROX	Rodamina X
RU	Unidades de respuesta <i>Response units</i>
SOC	Caldo superóptimo con represión por catabolito <i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
SAPE	Estreptavidina conjugada con ficoeritrina <i>Streptavidin r-phycoerythrin conjugate</i>
SAR	Relación estructura-actividad <i>Structure-activity relationship</i>
SEFIR	Expresión similar a los genes del factor de crecimiento de fibroblastos

SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido <i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SPR	Resonancia de plasmones superficiales <i>Surface plasmon resonance</i>
STAT	Transductor de señal y activador de transcripción <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosuccinidima
TBS	Suero tamponado con Tris <i>Tris-buffered saline</i>
Tc	Linfocitos T citotóxicos
TCR	Receptor de células T <i>T-cell receptor</i>
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta Transforming growth factor beta
Th	Linfocitos T cooperadores <i>T helper cells</i>
TLR	Receptor tipo Toll <i>Toll-like receptor</i>
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRAF	Factores asociados al receptor de TNF <i>TNF receptor associated factors</i>
UDG	Uracil ADN glucosilasa
Z'	Parámetro de calidad de HTS





RESUMEN



RESUMEN

La interleuquina 17 (IL-17) es una citoquina proinflamatoria que desempeña un papel central en la defensa contra patógenos extracelulares. En los últimos años se han desarrollado medicamentos dirigidos a esta citoquina debido a que su producción crónica y excesiva se relaciona con distintas enfermedades autoinmunes. La eficacia clínica de los anticuerpos terapéuticos que neutralizan IL-17A, IL-17F o el receptor IL-17RA en pacientes con psoriasis ha validado a estas proteínas como dianas farmacológicas. Sin embargo, el uso de medicamentos biológicos tiene algunas limitaciones entre las que se encuentran su elevado coste, así como la necesidad de utilizar una vía de administración parenteral.

Por ello, es necesario desarrollar nuevos métodos que permitan descubrir ligandos de bajo peso molecular que bloqueen la interacción entre IL-17A e IL-17RA y, por lo tanto, la señalización proinflamatoria que deriva de este complejo proteico.

En esta tesis doctoral se han combinado ensayos *in silico*, biofísicos y celulares con el objetivo de encontrar nuevos ligandos dirigidos a la interacción entre IL-17A e IL-17RA. En primer lugar, se llevó a cabo un cribado virtual para obtener una quimioteca focalizada de 67 compuestos. Posteriormente, se desarrolló un ensayo biofísico de unión basado en la tecnología de redistribución dinámica de masas que permitió priorizar los ligandos identificados en cuanto a su unión al dominio extracelular del receptor IL-17RA. Así, dos moléculas (CBG040591 y CBG060392) con estructuras químicas de quinazolinona y pirrolidinadiona se confirmaron como ligandos con afinidad micromolar, lo cual se demostró mediante un ensayo de resonancia de plasmones superficiales. Ambas moléculas alteraron la interacción entre IL-17A e IL-17RA siguiendo el modelo de interacción ligando-proteína de nuestros estudios realizados *in silico*.

La eficacia antiinflamatoria de ambos ligandos como inhibidores de la liberación de quimioquinas inflamatorias desencadenada por IL-17A se evaluó en un modelo de células tumorales de colon, así como en uno de queratinocitos humanos. Ambos ligandos inhibieron la liberación de CXCL1 en células de colon, y de CCL20 e IL-8 en queratinocitos, con unas concentraciones inhibitorias 50 en el rango micromolar. Además, CBG060392 redujo significativamente la expresión de *CCL20* y *CXCL8* inducida por IL-17A en los queratinocitos.

Una vez demostrada su eficacia en la inhibición de liberación de quimioquinas, se estudió la capacidad de los ligandos CBG040591 y CBG060392 para inhibir la señalización intracelular del receptor de IL-17A en queratinocitos humanos. CBG060392 bloqueó parcialmente la cascada canónica de señalización de NF- κ B, mientras que ambos compuestos mostraron una reducción de la expresión de C/EBP β . Asimismo, CBG060392 inhibió significativamente la señalización postranscripcional de IL-17RA a nivel de Regnasa-1.

Por lo tanto, se han identificado dos nuevos ligandos de bajo peso molecular dirigidos a la interacción entre IL-17A e IL-17RA con un efecto inhibitor robusto sobre la liberación de quimioquinas inflamatorias y sobre la cascada proinflamatoria desencadenada por la unión de IL-17A a su receptor. De esta manera, estos nuevos ligandos podrían ser moduladores de la respuesta inmunitaria mediada por IL-17 que se encuentra alterada en patologías inflamatorias con componente autoinmune como es la psoriasis.

ABSTRACT

Interleukin 17 (IL-17) is a proinflammatory cytokine that plays a central role in the defence against extracellular pathogens. Recently, drugs targeting IL-17 have been developed because its chronic and excessive production is related to several autoimmune diseases. Clinical efficacy of therapeutic antibodies that neutralize IL-17A, IL-17F or IL-17RA in patients with psoriasis has led to their validation as pharmacological targets. However, there are still limitations in the use of biological drugs, including their high cost, as well as the use of a parenteral route of administration.

Thus, it is necessary to develop new methods that allow the discovery of small-molecule ligands that block the interaction between IL-17A and IL-17RA and, therefore, the signalling of this proinflammatory pathway.

In this doctoral thesis, we combined *in silico*, biophysical and cell-based assays with the aim of finding new ligands that target the interaction between IL-17A and IL-17RA. First, we performed a virtual screening in order to obtain a 67-compound focused library. Subsequently, a biophysical binding assay based on dynamic mass redistribution technology was developed to prioritize these ligands in terms of their binding to the extracellular domain of receptor IL-17RA. Thus, two molecules (CBG040591 and CBG060392) with quinazolinone and pyrrolidinedione chemical scaffolds were confirmed as ligands with micromolar affinity, which was further demonstrated by means of a surface plasmon resonance assay. Both molecules disrupted the protein-protein interaction between IL-17A and IL-17RA following the ligand-protein model of interaction of our *in silico* studies.

The anti-inflammatory efficacy of both ligands as inhibitors of inflammatory chemokine release mediated by IL-17A was evaluated in a colon cancer cell model as well as in one of human keratinocytes. Both ligands inhibited the release of CXCL1 in colon cells, and of CCL20 and IL-8 in keratinocytes, with half maximal inhibitory concentration in the micromolar range. Furthermore, CBG060392 significantly reduced CCL20 and CXCL8 expression induced by IL-17A in keratinocytes.

Once the efficacy for the inhibition of chemokine release was demonstrated, the ability of CBG040591 and CBG060392 ligands to block the intracellular signalling of IL-17A receptor in human keratinocytes was studied. CBG060392 partially blocked the canonical NF- κ B cascade, while both compounds showed reduced C/EBP β expression. Likewise, CBG060392 significantly inhibited the post-transcriptional signalling of IL-17RA at Regnase-1.

Thus, we identified two new small molecules targeting the interaction between IL-17A and IL-17RA with a robust inhibitory effect on the release of inflammatory chemokines and also on the proinflammatory cascade triggered by IL-17A. In this regard, these novel ligands could be modulators of the immune response mediated by IL-17, which is altered in inflammatory pathologies with an autoimmune component such as psoriasis.



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. FISIOPATOLOGÍA DE LAS CITOQUINAS. LA INTERLEUQUINA 17

1.1. Las citoquinas participan en la regulación el sistema inmunitario

Las citoquinas son proteínas pequeñas que regulan y coordinan la homeostasis y las respuestas del sistema inmunitario. Como en otros ejemplos de evolución biológica, es frecuente que las citoquinas sean redundantes, es decir, que compartan funciones. También es común que una misma citoquina sea secretada por distintos tipos celulares y actúe sobre diversas clases de células (1). Pese a que son moduladores clave de la respuesta inflamatoria y tienen una función importante en la respuesta inmunitaria contra patógenos, su presencia excesiva o aberrante puede estar relacionada con la patogénesis de ciertas enfermedades del sistema inmunitario (2).

La inmunidad innata está siempre presente en el organismo y protege al hospedador contra agentes externos sin periodo de latencia y sin la necesidad de haber estado expuesto previamente a un determinado antígeno. Las citoquinas dirigen una rápida respuesta innata aguda, al ser capaces de regular la función de los leucocitos y otras células diana no inmunitarias. Dichas células tienen receptores para las citoquinas innatas, que son principalmente del tipo Toll (TLR), una clase de receptor que reconoce patrones y moléculas propias de los patógenos y las distingue de las del hospedador (3).

Los leucocitos son la fuente principal de citoquinas innatas como IL-1, IL-6, IL-12, TNF α , CXCL8, G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) y GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos). Estas citoquinas activan las células endoteliales cercanas al lugar de origen de la respuesta inmunitaria, así como las células inmunitarias residentes en la zona. A través de estas células se producen respuestas de retroalimentación positiva, que consisten principalmente en la liberación quimioquinas. En el endotelio se produce la adhesión de las células inmunitarias, se incrementa la viscosidad, se enlentece el flujo sanguíneo y se incrementa la permeabilidad vascular. De esta manera, se acumulan proteínas del complemento, de fase aguda o de la coagulación. Se produce, asimismo, el reclutamiento y la activación de células innatas como células T gamma/delta ($\gamma\delta$), NK (*natural killer*), NKT (*natural killer T cells*) o células linfoides innatas (*innate lymphoid cells*, ILCs). Como resultado de estos eventos locales se produce la inflamación (3).

Al mismo tiempo que se produce la inflamación local, las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF α actúan de forma sistémica. Las células presentadoras de antígeno procesan los antígenos externos, lo cual permite que se inicie la respuesta inmunitaria adaptativa (3). Este tipo de respuesta inmunitaria se caracteriza por ser específica de antígeno y por ser capaz de generar memoria. Los principales responsables de la misma son los linfocitos T CD4⁺ colaboradores (*T helper*, Th), cuya diversidad de receptores y capacidad de diferenciación permite la mencionada especificidad (3). Existen dos tipos principales de respuesta inmunitaria adaptativa: la humoral, que desarrollan los linfocitos B coordinados por los linfocitos Th2; y la celular, llevada a cabo por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Tc) y coordinada por los Th1 (4).

Las células presentadoras de antígeno procesan y exhiben los antígenos mediante moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) al receptor de células T (TCR). Para que estos linfocitos completen su activación precisan señales

coestimuladoras (3). Las citoquinas innatas liberadas determinan el subtipo de linfocito T colaborador que se activará (revisado en Raphael, 2014) (**figura 1**):

- Th1: inducidos por la IL-12, que activa los factores de transcripción STAT4 y T-bet. Sus citoquinas efectoras más características son INF- γ , IL-2 y TNF α . Los linfocitos Th1 activan a los macrófagos y dirigen respuestas contra patógenos intracelulares, coordinando a los linfocitos T citotóxicos.
- Th2: inducidos por la IL-4, que activa los factores de transcripción STAT6 y GATA3. Producen, entre otras, IL-4, IL-5 e IL-13. Los linfocitos Th2 coordinan la respuesta inmunitaria humoral y la mediada por IgE.
- Th17: inducidos por TGF- β (factor de crecimiento transformante beta) e IL-6, que activan los factores de transcripción STAT3 y ROR γ t. En la proliferación y mantenimiento de los linfocitos Th17 es fundamental la IL-23. Secretan IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 y activan neutrófilos y otras células para la defensa contra patógenos extracelulares (4,6).
- Linfocitos T reguladores (Treg): expresan el factor de Foxp3. Se caracterizan por producir IL-10 y TGF- β . Modulan la respuesta inmunitaria.
- Otros subtipos de linfocitos CD4⁺ son los Th9, los Th22 y los linfocitos T auxiliares foliculares.

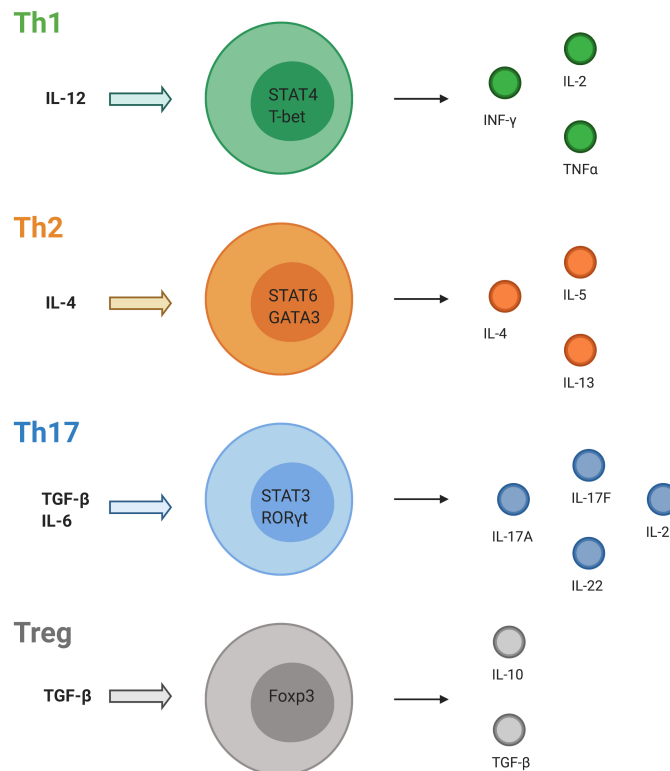


Figura 1. Subclases de linfocitos T cooperadores (Th). Además de los linfocitos mostrados (Th1, Th2, Th17 y Treg) existen otros subtipos, como los Th9, Th22 y los linfocitos T auxiliares foliculares. Imagen realizada por la autora.

Por todo ello, las citoquinas tienen un papel central en la respuesta inmunitaria y la inflamación, lo que hace que se consideren importantes dianas terapéuticas. Además, en muchas enfermedades son factores diagnósticos, pronósticos (marcan la actividad y gravedad de la misma) y terapéuticos (permiten evaluar la respuesta a un tratamiento dirigido). Los fármacos dirigidos a citoquinas pueden inmunomodularlas, favoreciendo sus efectos terapéuticos o atenuando sus efectos perjudiciales (3,7).

En general, los fármacos biológicos dirigidos a citoquinas que se utilizan en el tratamiento de enfermedades inflamatorias autoinmunes tienen un efecto farmacológico neutralizante, de modo que bloquean parcial o totalmente la actividad de una determinada citoquina. Es el caso de fármacos que bloquean $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-10, IL-2, IL-12/IL-23 o IL-17, utilizados ampliamente en patologías con componente inflamatorio (2,3).

1.2. La familia de la interleuquina 17 y sus receptores en la respuesta inmunitaria

La interleuquina 17 (IL-17) es una citoquina proinflamatoria que desempeña un papel central en la defensa contra patógenos extracelulares, como hongos y bacterias (6). Debido a que su producción crónica y excesiva se relaciona con distintas enfermedades autoinmunes, se ha convertido en una diana farmacológica muy atractiva para la investigación y desarrollo de medicamentos (8,9).

La IL-17 se clonó por primera vez en 1993, con el nombre de CTLA-8 (10). Una década más tarde se describió y clasificó un nuevo subtipo de linfocitos T CD4^+ (en contraposición a los existentes: Th1 y Th2), que se caracterizaba precisamente por la expresión de esta citoquina: los linfocitos Th17 (11,12).

La familia de la IL-17 se compone de seis miembros: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F. La IL-17A fue la primera en ser descubierta y es la que mejor se ha descrito hasta el momento (13). Todas estas citoquinas se secretan al medio extracelular como homodímeros unidos por un puente disulfuro y tienen un peso molecular de entre 17 y 21 KDa. Existe una relación estructural estrecha entre todas las citoquinas de esta familia, con una homología especialmente marcada entre IL-17A y IL-17F, que es de un 50 %. De hecho, ambas interleuquinas pueden ejercer su función como heterodímeros (9,13,14).

De igual modo, el receptor de IL-17 (IL-17R) es un dímero constituido por dos subunidades de las cinco existentes: IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE (**figura 2**). Todas ellas se definen por la presencia de un dominio SEFIR (expresión similar a los genes del factor de crecimiento de fibroblastos) en la región citoplasmática del receptor, que es similar al dominio Toll/IL-1R de las familias de los receptores tipo Toll y de la IL-1 (8,9,15,16). En la región extracelular, todos los receptores de IL-17 poseen dos dominios FN (tipo fibronectina III), que median las uniones a ligandos y a proteínas y podrían ser dianas para el bloqueo de IL-17R (4,8,14).

Así pues, la señalización de todas las citoquinas de la familia de IL-17 se produce a través de un receptor heterodimérico constituido por una cadena de IL-17RA común y otra variable, la cual determina su especificidad por una de estas citoquinas. Esta segunda cadena es IL-17RC para IL-17A e IL-17F; IL-17RB para IL-17E, que también puede unirse a IL-17B, aunque en este caso no está clara la presencia de la subunidad IL-17RA; e IL-17RE para IL-17C. El receptor de IL-17D no se ha definido hasta el momento (**figura 2**) (17–20).

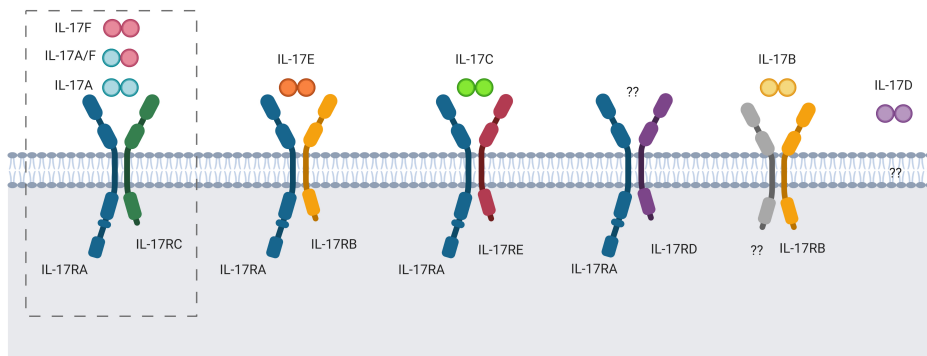


Figura 2. La familia de la interleuquina 17. Se muestran los receptores heterodiméricos IL-17R y los distintos miembros de la familia de citoquinas. Imagen modificada de Amatya *et al.*, 2017 con el permiso de Elsevier®.

Pese a que IL-17A e IL-17F comparten el receptor (IL-17RA/IL-17RC), IL-17RA tiene una afinidad 100 veces mayor por IL-17A que por IL-17F. Para el heterodímero constituido por IL-17A/IL-17F la afinidad de IL-17RA es intermedia, y menor para IL-17B, C, D y E (21,22).

Así, se han analizado las uniones de IL-17RA a IL-17A y IL-17F mediante cristalografía (**figura 3**). Ambas citoquinas emplean los mismos aminoácidos en esta interacción ligando-receptor, lo que indica que la conformación de IL-17RA está conservada y, en consecuencia, apoya la hipótesis de que sea el receptor común para las otras citoquinas de la familia de IL-17. Los cambios conformacionales en IL-17 ocasionados por esta unión citoquina-receptor tienden a desfavorecer la unión de una segunda cadena de IL-17RA al complejo, probablemente mediante un mecanismo alostérico (23).

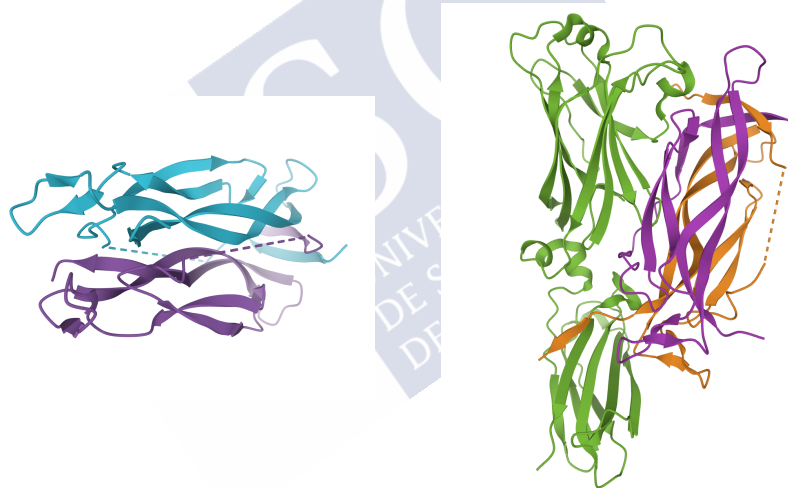


Figura 3. Estructura cristalina del homodímero de la interlequina-17A humana y en complejo con IL-17RA. A la izquierda se encuentra el homodímero de IL-17A. A la derecha se representa dicho homodímero (púrpura y naranja) junto con IL-17RA, en verde. Estructuras 4HR9 y 4HSA extraídas de PDB (Protein Data Bank) (23).

1.3. Células del sistema inmunitario productoras de la interleuquina 17

Aunque se considera que los linfocitos Th17 son la fuente principal de IL-17, existen otros tipos de células del sistema inmunitario adaptativo e innato que liberan esta interleuquina: algunos linfocitos T CD8⁺ (Tc17), células NK, células T $\gamma\delta$ o células linfoides innatas de tipo 3 (ILC3s) (24,25) (**figura 4**). La secreción de IL-17 por parte de estas células se produce debido a la estimulación de las mismas por otras citoquinas proinflamatorias (como IL-1 β o IL-23), así como por metabolitos derivados de patógenos extracelulares (26). Pese a que no está exento de controversia, también se ha propuesto que células de la serie mieloide produzcan IL-17A, como son los neutrófilos, macrófagos o mastocitos (21,24).

En relación a los linfocitos Th17, su diferenciación está mediada por TGF- β e IL-21 o IL-6, que inducen la transcripción del receptor huérfano gamma relacionado con el receptor de ácido retinoico (RAR) γ t (ROR γ t). La presencia de una de estas citoquinas, junto con IL-1 β , induce la expresión del receptor de IL-23 y permite, de este modo, la expansión y estabilización de los linfocitos ya diferenciados por acción de la interleuquina 23 (4,27). Los linfocitos Th17 liberan otras citoquinas además de IL-17A: IL-17F, IL-22, IL-21, IL-26, CCL20 y GM-CSF (28).

Tanto ROR γ t como STAT3 son necesarios para el desarrollo adecuado de los linfocitos Th17 (28). ROR γ t desempeña un papel esencial para el funcionamiento patogénico de las Th17. Así, junto con IL-23 hace que ambas sean dos dianas farmacológicas de interés para su modulación con moléculas pequeñas (en el caso de ROR γ t), o con anticuerpos neutralizantes (en el caso de IL-23) (29–31), como se verá en el apartado 3.1.

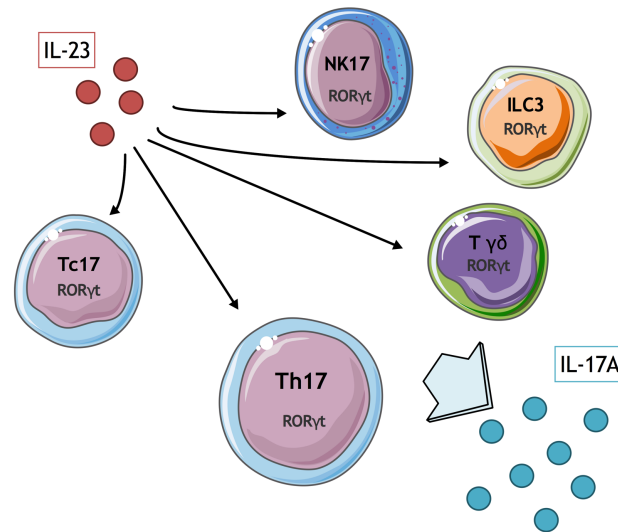


Figura 4. Células productoras de la interleuquina 17. Linfocitos T CD4+ (Th17), linfocitos T CD8+ (Tc17), células NK, células T $\gamma\delta$ y células linfoides innatas de tipo 3 (ILC3s). Imagen realizada por la autora.

1.4. Mecanismos de señalización del receptor de IL-17A

La cascada de señalización IL-17RA se produce en las células diana de la interleuquina 17. El receptor IL-17RA se encuentra ampliamente distribuido por todo el organismo, tanto en células hematopoyéticas como no hematopoyéticas (32,33). Otros receptores de la familia se expresan solamente en algunos tipos celulares, lo que explica la especificidad de algunas de las citoquinas de la familia de IL-17 por determinadas células (21).

La vía de señalización IL-17/IL-17RA se inicia con el reclutamiento de Act1 por el dominio SEFIR del receptor (**figura 5**). Act1 es un adaptador citosólico necesario para la activación de todas las vías de señalización conocidas que dependen de los IL-17R (8,34).

Act1 actúa como una ligasa E3 de ubiquitina y ubiquitina a TRAF6 (y otros TRAF) que, a su vez, activa las cascadas NF- κ B y MAPK (proteína quinasas activadas por mitógenos), de modo que se

regula la transcripción de genes inflamatorios (8,35,36). Asimismo, Act1 tiene una función relevante como proteína de unión a ARN (35,37).

Por otro lado, TRAF6 puede activar C/EBP β y C/EBP δ (CCAAT/*enhancer-binding protein* beta y delta), factores que median la transcripción de muchos de los genes diana de la IL-17 (35,38,39) (**figura 5**).



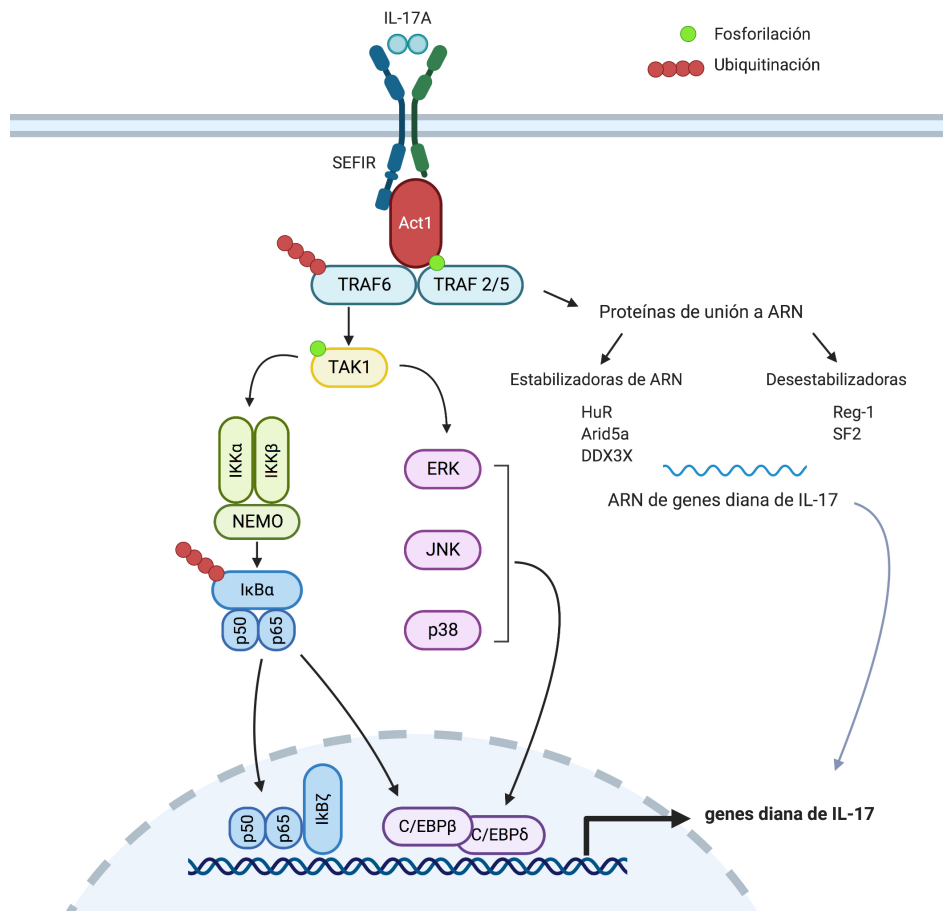


Figura 5. Señalización del receptor de IL-17A. La señalización de IL-17A empieza con la unión de esta citoquina a su receptor IL-17RA/IL-17RC. El dominio SEFIR del receptor recluta Act1, que activa varias cascadas. TRAF6 desencadena las de NF-κB y MAPK, así como C/EBPβ y C/EBPδ, que conducen a la transcripción de genes inflamatorios. TRAF2 y TRAF5 regulan el control de la estabilidad de los ARNm de los genes diana de IL-17. Imagen realizada por la autora.

1.4.1. *Vía de señalización de NF- κ B*

Act1 actúa como una ligasa E3 de ubiquitina, que recluta y ubiquitina TRAF6 en la lisina-63 (y otros TRAF). De esta forma, se activan la TAK1 (quinasa activada de factor de crecimiento transformante) y el complejo inhibidor de NF- κ B (IKK) (8,39,40) (**figura 5**).

IKK fosforila la subunidad I κ B (perteneciente al complejo NF- κ B : I κ B), marcándola para ser reconocida por el sistema de degradación del proteasoma. Esta degradación permite la liberación de NF- κ B (p50 y p65), que se trasloca al núcleo e inicia la inflamación (8,41) (**figura 5**).

Así pues, la unión de IL-17 a su receptor activa esta vía de señalización de NF- κ B y, por el contrario, no lo hace a través de la vía no canónica de NF- κ B (15). A pesar de ello, la vía canónica de NF- κ B incrementa la expresión de I κ B ζ (un factor de transcripción no canónico) que, a su vez, regula la expresión de muchos de los genes dependientes de IL-17 (8,38).

1.4.2. *Vía de las MAPK. C/EBP β y C/EBP δ*

Como se indicó anteriormente, la proteína TRAF6 poliubiquitinada que activa TAK1 contribuye a la activación de las vías de las MAPK inducidas por IL-17: ERK, p38 y JNK (quinasas c-Jun N-terminal) (8,35) (**figura 5**).

Asimismo, la expresión de los factores de transcripción C/EBP β y C/EBP δ se ve incrementada por la señalización de IL-17 (35). Ambos son necesarios para la activación y expresión de algunos de los genes diana de IL-17 (42,43).

A diferencia de la regulación de C/EBP δ , que es transcripcional, C/EBP β está regulado a múltiples niveles: se activa por su fosforilación tras la activación de la vía de señalización ERK1/2 y GSK3 β procedentes de la cascada de IL-17, entre otras, y está

regulado postranscripcionalmente a través de la fosforilación de residuos específicos (8,35).

1.4.3. Señalización postranscripcional

Además de regular la transcripción de genes, IL-17 también controla la expresión de una serie de genes diana a nivel de la estabilidad de sus ARN postranscripcionales. Los ARN de moléculas inflamatorias suelen ser intrínsecamente inestables por lo que este incremento de su permanencia mediado por IL-17 permite producir sus proteínas efectoras más eficientemente (8,35).

Esta regulación se produce principalmente a nivel de Act1, pero es independiente de TRAF6. Para ello, Ikki (IKK ϵ) fosforila Act1, que recluta TRAF2 y TRAF5. Estos factores permiten estabilizar el ARN mediante el control de distintas proteínas de unión a ARN, como son HuR, Arid5a o DDX3X (8,35,38,39,44,45) (**figura 5**).

1.4.4. Mecanismos de regulación negativa

Las proteínas que median acciones que facilitan la estabilización de ARN están reguladas por otras proteínas de unión a ARN que permiten su destrucción y, de este modo, paran una señalización inflamatoria potencialmente destructiva (38). Es el caso de la Regnasa-1 (también conocida como ZC3H12A) o el factor de unión multifuncional a proteínas de unión a ARN SF2 (35,46,47) (**figura 5**).

De forma similar a la regulación postranscripcional negativa, existen otros mecanismos que previenen una posible sobreactivación de la señalización de IL-17. Así pues, TRAF3 y TRAF4 compiten con Act1 o TRAF6 por su unión a IL-17RA (39,48). Por otro lado, la proteína A20 es una desubiquitinasa que elimina la ubiquitinación de TRAF6 y, en consecuencia, limita su presencia en la activación de las cascadas de NF- κ B y MAPK. Es interesante el hecho de que A20 interacciona directamente con uno de los dominios inhibidores de IL-17RA (47).

2. LAS FUNCIONES BIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS DE LA INTERLEUQUINA 17

2.1. El papel fisiológico de IL-17. Actividad inflamatoria

Una de las principales funciones de IL-17 consiste en inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6, G-CSF, IL-1 β o TNF; quimioquinas como CXCL1, CXCL8 (o IL-8), CXCL9, CXCL10, CXCL5, CCL2, CCL7 o CCL20; metaloproteinasas de la matriz (MMPs) como MMP-1, -2, -3, -8, -9 o -13; o proteínas antimicrobianas (AMPs). Esta inducción de mediadores de la inflamación ocurre principalmente en células no hematopoyéticas que expresan el receptor IL-17RA/IL-17RC (26,38,49,50).

En el caso de la liberación de agentes quimiotácticos (como CXCL8) inducida por IL-17, estos incrementan la presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y producen, en consecuencia, la granulopoyesis y la migración de neutrófilos. Este es uno de los papeles fundamentales de IL-17 en la respuesta inflamatoria. Ocurre de forma análoga con la liberación de quimiotácticos para linfocitos, monocitos y células dendríticas (9,26,35).

Todas estas respuestas causadas por IL-17 definen su principal papel fisiológico, que reside en la defensa del organismo contra infecciones extracelulares bacterianas (como *Staphylococcus* o *Klebsiella*) y fúngicas (como *Candida*) en las mucosas y epitelios. Estos incluyen, entre otros, la piel, el intestino, el pulmón o la cavidad oral (9,38).

De hecho, la sobreexpresión de IL-17 en modelos animales se relaciona con una mejor eliminación de patógenos como *Klebsiella pneumoniae* (51). De manera similar, los niveles de esta citoquina también se encuentran aumentados en infecciones pulmonares agudas por *Pseudomonas aeruginosa* (52).

Por el contrario, su deficiencia, tanto en modelos animales como en humanos con alteraciones genéticas, se asocia a un incremento en la susceptibilidad a las infecciones por *Candida albicans* o por *Staphylococcus aureus* (especialmente en la piel y en la mucosa oral). Esto demuestra que IL-17 es indispensable para la respuesta inmunitaria mucocutánea contra estos microorganismos (53–57).

La respuesta de IL-17 sobre la integridad de las barreras epiteliales facilita que los agentes patógenos se mantengan fuera del organismo, puesto que esta citoquina contribuye a que el epitelio se estreche. Si la barrera pierde su integridad estimula la respuesta de neutrófilos y macrófagos a través de la producción de citoquinas inflamatorias. Estas células tienen capacidad fagocítica, lo que permite eliminar las bacterias patógenas (26).

Al inducir la liberación de citoquinas inflamatorias, IL-17 contribuye a que se continúe su propia secreción y se mantengan sus efectos, en un ciclo de retroalimentación positiva (58). Esto lleva al reclutamiento y expansión de un gran número de células del sistema inmunitario en el lugar de infección, que refuerza la respuesta inflamatoria (26).

2.2. La actividad inflamatoria de IL-17: sinergias

La capacidad de sinergia de IL-17 con otros estímulos inflamatorios es fundamental para su actividad ya que esta, junto con la de reclutamiento de células del sistema inmunitario a través de la liberación de quimioquinas, hacen que IL-17 sea un potente inductor de la inflamación. De hecho, por sí misma, la IL-17 no es una citoquina potente en la inducción de la actividad inflamatoria. Esto se hace evidente en el caso de la activación de la vía de señalización de NF- κ B: IL-17 solo es un activador débil de esta vía inflamatoria, que es, a su vez, esencial en la cascada desencadenada por la unión de la citoquina a su receptor (8,26).

El caso más estudiado es el de su sinergia con $\text{TNF}\alpha$, que se produce principalmente por la estabilización de los transcritos inducidos por $\text{TNF}\alpha$ por parte de IL-17 (8,9,59,60). Sin embargo, esta cooperación también ocurre en la activación de la familia de los C/EBP (61).

Asimismo, también se producen sinergias con linfotoxina, $\text{IFN-}\gamma$, IL-1 β o IL-22. A pesar de que los mecanismos moleculares por los que se producen muchas de estas actividades sinérgicas no están descritos en detalle, están probablemente relacionados con la regulación de la cascada de IL-17 a nivel transcripcional o postranscripcional (26,38,50,62).

2.3. La actividad de las otras citoquinas de la familia de IL-17: IL-17B a F.

La **IL-17F** es la citoquina más similar a IL-17A y, pese a que es menos potente, se expresa en las mismas células y desarrolla una función similar en los tejidos diana (14,38). De esta manera, los linfocitos Th17, T $\gamma\delta$ o ILC3s liberan IL-17F (14). Los niveles de esta citoquina, del mismo modo que ocurre con IL-17A (como se verá en el apartado 2.5.1), también se encuentran elevados en lesiones de psoriasis (15,63,64). De forma análoga a IL-17A, IL-17F participa en la protección contra infecciones fúngicas y bacterianas y en el mantenimiento de los sistemas defensivos y de integridad de las membranas mucosas (14).

Tanto la expresión de **IL-17B** como **IL-17D** está disminuida en las lesiones de psoriasis (64), y sus funciones se conocen menos que las de otras citoquinas de la familia de IL-17. Es probable que IL-17B e IL-17D participen en la respuesta inflamatoria en tejidos como el articular. Ambas presentan una homología del 27 % entre sí (14).

La **IL-17C** también se encuentra sobreexpresada en las lesiones de pacientes con psoriasis, de forma similar a IL-17A e IL-17F (65). Es secretada principalmente por células epiteliales (sobre todo del

intestino y de la piel), a diferencia de las demás citoquinas de la familia, que se producen en células del sistema inmunitario. Asimismo, IL-17C produce un efecto autocrino sobre las células epiteliales que la secretan, de forma que las protege de las infecciones bacterianas al inducir la expresión de genes diana proinflamatorios (14,38).

La **IL-17E** (IL-25) es el miembro de la familia de la IL-17 menos homólogo con IL-17A, puesto que comparten solo el 16 % de su secuencia (14). Pese a ser un regulador de la respuesta inmunitaria de los linfocitos Th17, su papel en el sistema inmunitario se relaciona con el de los linfocitos Th2, que se corresponde con las alergias, los procesos asmáticos y la defensa contra parásitos (14,38,66).

2.4. El papel de IL-17 en las patologías relacionadas con el sistema inmunitario

A pesar de la importancia de IL-17 como mediador de respuestas inmunitarias en la defensa contra patógenos extracelulares, una activación excesiva y la presencia crónica de esta citoquina en el organismo puede contribuir a la aparición enfermedades inflamatorias autoinmunes (9,21).

2.4.1. *IL-17 en las enfermedades reumáticas autoinmunes*

La artritis psoriásica es una enfermedad que se caracteriza por la inflamación crónica de las articulaciones, y afecta al 25 % de los pacientes con psoriasis, aproximadamente (9). Así, además de las manifestaciones cutáneas, se presenta artritis periférica, dactilitis o uveítis. Tanto en el líquido sinovial como en la sangre periférica de estos pacientes se encuentran niveles elevados de linfocitos Th17 y Tc17 (67,68).

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica que se caracteriza por la sinovitis, la destrucción del cartílago y el hueso articular (9). En el líquido sinovial y en la sangre periférica de pacientes con artritis se han encontrado niveles elevados de IL-17A que se correlacionan con su estado clínico (69).

La espondilitis anquilosante es una enfermedad autoinmune que afecta principalmente a las articulaciones sacro-ilíacas y vertebrales, en las que se forma hueso de manera ectópica (9). En la sangre periférica de pacientes con espondilitis anquilosante se han encontrado niveles elevados de IL-17 e IL-23, así como de linfocitos Th17 y células ILC3 (70–72).

2.4.2. IL-17 en la esclerosis múltiple

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune crónica que se caracteriza por la destrucción de las vainas de mielina por parte de linfocitos T autorreactivos (9). Se han encontrado linfocitos productores de IL-17 en lesiones activas del sistema nervioso central de pacientes con esclerosis múltiple (73).

2.4.3. IL-17 en la enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria intestinal caracterizada por la inflamación de la mucosa digestiva. El papel de IL-17 en esta patología no está claro, y parece ser tanto protector como favorecedor de la actividad inflamatoria en esta enfermedad (9,74,75).

2.4.4. IL-17 en la dermatitis atópica

La dermatitis atópica es una patología que se caracteriza por la inflamación crónica de la piel causada por una respuesta inmunitaria

exagerada a antígenos ambientales. Se ha descrito que la IL-17 se encuentra elevada en el suero de niños con dermatitis (cuya prevalencia puede ser entre el 10 y el 20 %), y se correlaciona con la severidad de las manifestaciones clínicas (21,76).

2.4.5. *IL-17 en el cáncer*

Históricamente, la respuesta inmunitaria relacionada con el cáncer se ha buscado en los linfocitos T CD8+. Sin embargo, la importancia de las células T CD4+ en la patología tumoral está demostrada, ya que se encuentran infiltradas en el tumor (77). Se ha definido la relación entre los marcadores genéticos de la presencia de linfocitos T CD8+ y Th1 y la progresión y supervivencia de los pacientes, así como el papel de estas células en la respuesta a los inhibidores de “*checkpoints*” inmunitarios, como la inmunoterapia anti-CTLA4 o anti-PD1 (38).

En el caso de otra clase de linfocitos T CD4+, los Th17, el incremento de su infiltración en el tejido tumoral se ha relacionado con peores pronósticos. La interleuquina 17 se ha asociado con la oncología, además de por ser la principal citoquina liberada por las células Th17, por su importante papel en la inflamación crónica tisular. Se han observado niveles elevados de IL-17 en suero y tejido tumoral de pacientes con distintos tipos de cáncer (38,77–79). Un mayor conocimiento del papel de esta interleuquina en los mecanismos tumorales podría ofrecer nuevas oportunidades para el desarrollo de nuevas terapias oncológicas.

2.5. **Psoriasis**

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que afecta entre un 2 y un 3 % de la población mundial. La prevalencia de esta patología depende de la edad, la localización geográfica y la genética de los pacientes. Así, es más común en los

caucásicos, y se suele desencadenar en torno a la segunda década de vida. Es una enfermedad asociada a un grado de morbilidad elevado, reduce la calidad de vida de los pacientes y genera importantes costes sociales y económicos en los sistemas sanitarios (80,81).

La psoriasis se clasifica en distintos tipos dependiendo de sus características clínicas:

- La psoriasis en placas (o *vulgaris*): es la más común, afecta aproximadamente al 90 % de los pacientes. Se caracteriza por la presencia de lesiones eritematosas bien delimitadas, con escamas plateadas. Normalmente afecta a las superficies extensoras del cuerpo, como codos y rodillas, al área lumbosacra, a la región umbilical o al cuero cabelludo (80,82–84).
- Psoriasis invertida o flexora: es específica de sitio, de modo que se produce en las flexuras y áreas intertriginosas. Se caracteriza por placas y áreas eritematosas ligeramente erosivas (83–85).
- Psoriasis seborreica: se caracteriza por la presencia de placas grasientas en codos, la zona pre-esternal, los pliegues nasolabiales y las cejas (83).
- Psoriasis pustulosa: se caracteriza por la presencia de pústulas monomórficas pequeñas que se fusionan sobre la piel inflamada (83,84).
- Psoriasis en gotas (*guttata*): se caracteriza por pápulas eritematosas diseminadas, que se suelen presentar en el tronco. Se ha observado que la infección por estreptococo beta-hemolítico (en forma de faringitis) es un factor desencadenante de esta presentación clínica (82,83).
- Psoriasis eritrodérmica: es una complicación aguda y rara pero grave de la psoriasis. Ocurre cuando el eritema y la inflamación afecta a toda la superficie del cuerpo (más del 90 % de la misma), de forma que se pone en riesgo la vida del paciente (84,85).

Aproximadamente en la mitad de los pacientes se produce psoriasis en las uñas, que presentan áreas amarillas o marrones bajo

la lámina ungueal, que se pueden engrosar y resultar en la distrofia absoluta de la uña (83,84). Entre el 10 y el 30 % de los pacientes con psoriasis desarrollan artritis psoriásica (81,86).

La psoriasis suele presentarse en forma de brotes seguidos por periodos en remisión. Puede desencadenarse por causas no específicas, como traumatismos suaves, quemaduras solares, tabaco, estrés, irritantes químicos o infecciones, y algunos fármacos pueden exacerbar el cuadro. La fase de mantenimiento se caracteriza por la inflamación crónica (81,84,85).

Las placas psoriásicas son el resultado de cambios en la epidermis, que está engrosada, lo que se denomina acantosis. Se produce hiperproliferación de queratinocitos (hiperqueratosis), además de su maduración prematura, que lleva a una cornificación incompleta y a la presencia de núcleos celulares en el estrato córneo (paraqueratosis) (80,84). En una epidermis sana, los queratinocitos se diferencian desde el estrato espinoso y granular hasta el estrato córneo. En este sintetizan queratinas específicas y lípidos, salen del ciclo celular y mueren, perdiendo el núcleo y forman, así, la barrera de corneocitos que sirve como sistema de defensa (81,87).

El eritema característico de la psoriasis se debe a la angiogénesis que se produce en la dermis. Además, se presenta un infiltrado de células del sistema inmunitario tanto en la capa dérmica como en la epidérmica (80,84). Estos cambios clínicos y su severidad se cuantifican mediante el índice PASI (*Psoriasis Area and Severity Index*), que mide eritema, grosor, extensión, infiltración y descamación (88).

Existen factores ambientales y genéticos que explican la predisposición y aparición de psoriasis en un paciente. Entre los genes implicados en esta patología se incluyen aquellos relacionados con la inflamación, la proliferación y la diferenciación de la epidermis (80,82). Así, existen factores de riesgo genéticos para el desarrollo de psoriasis que afectan a las vías de señalización proinflamatorias. Es el caso de variantes de la interleuquina 12B (*IL12B*) y el receptor de la interleuquina 23 (*IL23R*), que condicionan

el papel de los linfocitos Th17 en la psoriasis. Se presentan alteraciones en proteínas moduladoras de la cascada de señalización de NF- κ B, como TNFAIP3 o TNIP1, que podrían afectar a la proliferación de los queratinocitos. Asimismo, se han establecido asociaciones genéticas en poblaciones con polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en MHC de clase 1 (89).

Aunque lo más característico es la afectación cutánea, la psoriasis es una enfermedad sistémica relacionada con desregulación del sistema inmunitario, como se describe en el apartado 2.5.1. De hecho, los pacientes con psoriasis pueden presentar comorbilidades importantes, entre las que se incluyen el síndrome metabólico (obesidad, hipertensión, diabetes, dislipemia), la depresión o el cáncer (80,84,85).

2.5.1. Patogénesis de la psoriasis. El papel de IL-17

Existe una evidencia directa del papel central que desempeña la interleuquina 17 en la patogénesis de la psoriasis. Así, se han encontrado niveles elevados de IL-17 y citoquinas relacionadas con los linfocitos Th17 (como IL-22 e IL-23) en las lesiones de pacientes con psoriasis (90). En estas lesiones también se expresan IL-17F e IL-17C. Dichos niveles de IL-17A en la piel no se correlacionan con una elevación sistemática en el suero de los pacientes, a diferencia de los niveles de TNF α , para los que sí existe esta correlación. Se postula que se debe a que la producción más importante de IL-17A se produce de forma local en la piel (91). De la misma manera, se ha encontrado que los genes derivados de la actividad inflamatoria de IL-17 están regulados positivamente en la piel de pacientes con psoriasis (92).

En relación a la patogénesis de la psoriasis, la inflamación que ocurre en esta se debe a una falta de regulación de la respuesta inmunitaria cutánea que afecta tanto al sistema inmunitario innato como adaptativo. Su fenotipo en la epidermis se explica por la

interacción de los queratinocitos con distintas células del sistema inmunitario (84,85) (**figura 6**).

En los primeros estadios de la patología intervienen las células dendríticas. El origen de la activación de este tipo celular no está claro. Podrían estar respondiendo a un daño señalado por los propios queratinocitos en forma de péptidos antimicrobianos, como LL37, β -defensina o S100 (85). Las células dendríticas activadas secretan $\text{TNF}\alpha$, IL-23 e IL-12. En consecuencia, se activan los linfocitos Th17, Tc17 (ambos dependientes de IL-23) y Th1 (dependiente de IL-12), que mantienen la inflamación (85,91) (**figura 6**).

Estos linfocitos T activados proliferan y migran a la epidermis, donde reconocen autoantígenos, como el péptido antimicrobiano LL37 (72). Producen IL-17, IL-22, $\text{TNF}\alpha$ e IL-26, que contribuyen a la hiperplasia y la paraqueratosis, así como a la expresión de proteínas relacionadas con la psoriasis en los queratinocitos (85,93–96) (**figura 6**).

De esta manera, los queratinocitos activados por las citoquinas derivadas de los linfocitos T retroalimentan la cascada inflamatoria liberando IL-1 β , IL-6, $\text{TNF}\alpha$, IL-17C, péptidos antimicrobianos (como S100) y quimioquinas, entre las que se encuentran CXCL1, CXCL8, CXCL5, CXCL3 y CCL20 (**figura 6**).

De igual modo que ocurre en otros procesos inflamatorios, la fuente de IL-17 en la psoriasis no sólo se encuentra en los linfocitos 17 (Th17 y Tc17), sino en otros tipos celulares. Es el caso de los mastocitos, linfocitos T $\gamma\delta$, linfocitos T $\alpha\beta$ e ILC3, y potencialmente los neutrófilos, que poseen un papel controvertido en la liberación de IL-17 (92,95,97). Las dianas de IL-17, además de los queratinocitos, son células del sistema inmunitario innato y células endoteliales. Estas contribuyen a la respuesta inflamatoria con la producción de IL-23, que retroalimenta la diferenciación, proliferación y activación de los linfocitos 17 (85,92).

Este papel central del eje IL-23-IL-17, junto con TNF α , es especialmente relevante en la patogénesis de la psoriasis en placas. Sin embargo, existen otras vías de señalización inflamatoria implicadas en otros fenotipos de psoriasis. Es el caso del IFN γ en la psoriasis en gotas o eritrodérmica; o de la IL-1 y la IL-36 en la psoriasis pustulosa, en la que el sistema inmunitario innato parece tener un papel más importante (85,92,96).

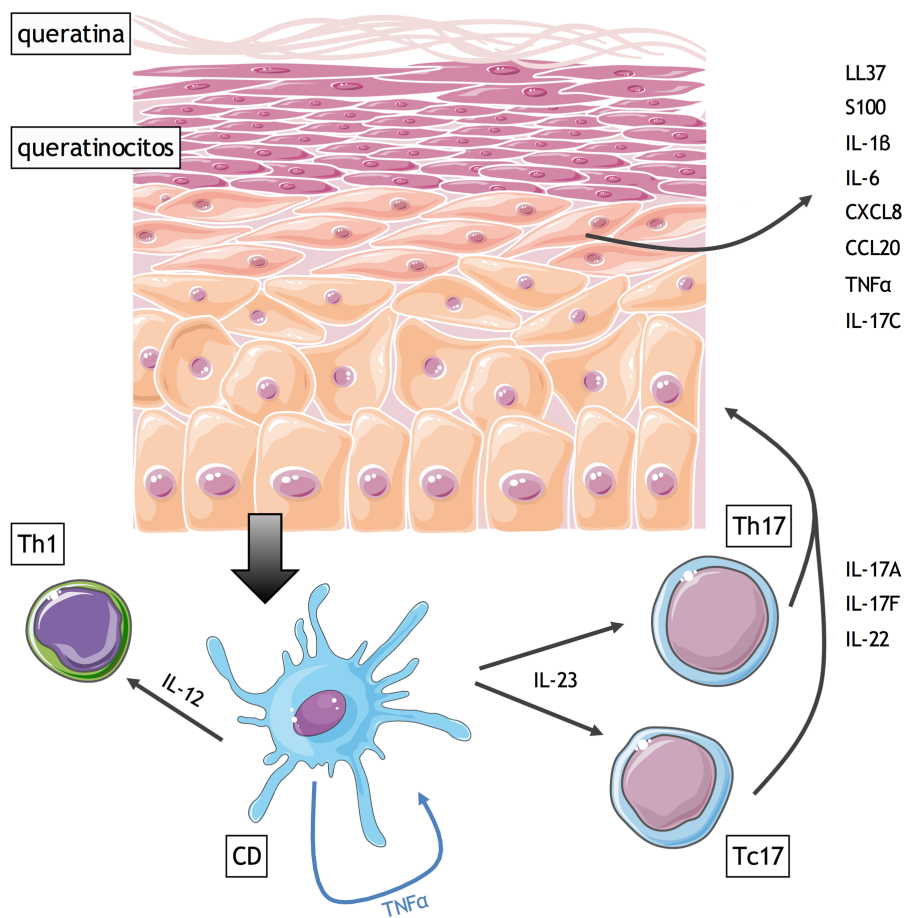


Figura 6. Patogénesis de la psoriasis. Las células dendríticas (CD) responden a las

señales de los queratinocitos y secretan TNF α , IL-12 e IL-23. Así, se activan los linfocitos Th1 (dependiente de IL-12), Th17 y Tc17 (dependientes de IL-23), que producen citoquinas que contribuyen a la hiperplasia y la paraqueratosis. Los queratinocitos retroalimentan la cascada inflamatoria liberando péptidos antimicrobianos, citoquinas y quimioquinas. Imagen realizada por la autora.

3. TERAPIAS DIRIGIDAS A LA INTERLEQUINA 17 PARA LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

La respuesta crónica de IL-17 tiene un papel central en la patogénesis de algunas enfermedades autoinmunes, lo cual se demostró con el éxito clínico del bloqueo de esta diana terapéutica en pacientes con psoriasis (38,98).

Hay dos opciones principales para el diseño de un agente terapéutico dirigido específicamente a la vía de señalización de IL-17: el bloqueo de IL-17A, IL-17F o de su receptor; o el bloqueo de la diferenciación o función de los linfocitos Th17 mediante la inhibición de IL-23 o el receptor nuclear ROR γ t. Así, como primer paso en la terapia de esta vía se diseñaron anticuerpos monoclonales, cuya ventaja principal reside en que son específicos para la proteína a la que van dirigidos que, además, bloquean de forma directa (9) (**figura 7**).

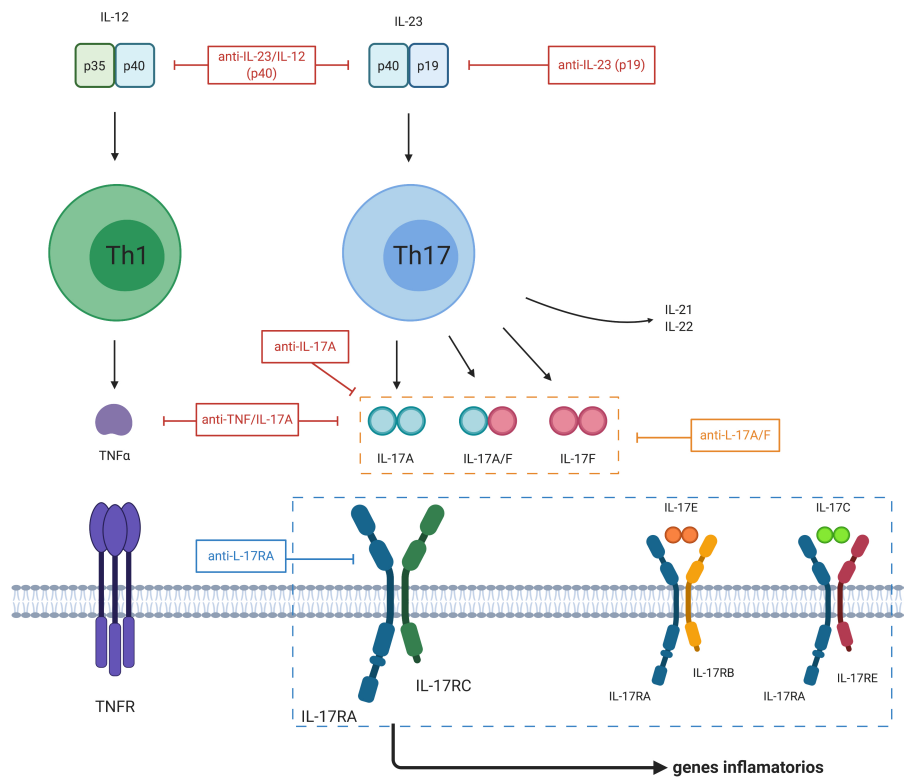


Figura 7. Terapias dirigidas a la vía de IL-17. Los agentes terapéuticos dirigidos específicamente a la vía de señalización de IL-17 pueden bloquear directamente IL-17A, IL-17F o su receptor; o bloquear la diferenciación y/o función de los linfocitos Th17 mediante la inhibición de la IL-23. Imagen realizada por la autora.

3.1. IL-17 como diana terapéutica

Se han diseñado anticuerpos monoclonales específicos para IL-17A, IL-17F y para el receptor IL-17RA. En este último caso, su bloqueo permitiría interrumpir la señalización de IL-17A, IL-17F, IL-17C e IL-17E (IL-25) (9,38) (**tabla 1**).

- Secukinumab es un anticuerpo monoclonal humano de tipo IgG1 κ . Se une de forma selectiva a IL-17A con una afinidad elevada (99).
- Ixekizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG4 κ . De igual modo que secukinumab, se une con afinidad alta y neutraliza a la IL-17A (99).
- Bimekizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG1 κ que se une y neutraliza a IL-17A e IL-17F (99). La inhibición de ambas citoquinas al mismo tiempo permite un bloqueo más eficaz que el de ambas por separado, tal y como se demostró *in vitro*, con la supresión de la producción de citoquinas y consecuente quimiotaxis de neutrófilos (100).
- Brodalumab es un anticuerpo monoclonal humano de tipo IgG2 κ que se une al receptor IL-17RA, de forma que inhibe la actividad de IL-17A, IL-17F, IL-17C e IL-17E (99).

3.2. IL-23 como diana terapéutica

La interleuquina 23 es una citoquina heterodimérica, formada por las subunidades p19 y p40, esta última compartida con la IL-12. Debido a su papel en la activación y función de los linfocitos Th17 y Tc17, la inhibición de IL-23 con anticuerpos monoclonales permite bloquear la producción de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (9) (**tabla 1**).

- Ustekinumab es un anticuerpo monoclonal humano de tipo IgG1 κ que se une con afinidad elevada a la subunidad p40 de IL-12 e IL-23 (99).
- Briakinumab es un anticuerpo monoclonal humano de tipo IgG1 que se une a la subunidad p40 de IL-12 e IL-23 (99).
- Guselkumab es un anticuerpo monoclonal humano de tipo IgG1 λ que se une a la subunidad p19 de IL-23 (99).

- Tildrakizumab es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG1 κ que se une a la subunidad p19 de IL-23 de forma selectiva (99).
- Risankizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG1 κ que se une a la subunidad p19 de IL-23 de forma selectiva (99).
- Mirikizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG4 κ , que se une a la subunidad p19 de IL-23 (99).



Tabla 1. Anticuerpos monoclonales terapéuticos dirigidos a la vía de señalización de IL-17.

Diana	Anticuerpo	Psoriasis*	Eficacia
IL-17A	Secukinumab	Aprobado	PASI 75/90/100 82/79/44 % ^{1,2}
	Ixekizumab	Aprobado	PASI 75/90/100 84/70/49 % ³
	CJM112	Fase I/II	
	BCD 085	Fase III	
IL-17RA	Brodalumab	Aprobado	PASI 75/90/100 86/76/44 % ⁴
IL-17A/IL-17F	Bimekizumab	Fase II	
	ALX-0761	Fase II	
IL-23 p40	Ustekinumab	Aprobado	PASI 75 89 % ⁵
IL-23 p19	Guselkumab	Aprobado	PASI 75/90 89/76 % ⁶
	Tildrakizumab	Aprobado	PASI 75/90/100 78/58/29 % ⁷
	Risankizumab	Aprobado	PASI 75/90/100 89/73/47 % ⁸
	Mirikizumab	Fase III	

¹Richard G. Langley *et al.*, 2014; ²Thaçi *et al.*, 2015

³Blauvelt, Gooderham, *et al.*, 2017

⁴M. Lebwohl *et al.*, 2015

⁵R. G. Langley *et al.*, 2015

⁶Blauvelt, Papp, *et al.*, 2017

⁷Sinclair y Thirthar Palanivelu, 2019

⁸Mylle *et al.*, 2018

*Aprobados por la EMA para psoriasis en placas.

3.3. ROR γ t como diana terapéutica

ROR γ t es un factor de transcripción necesario para la diferenciación de los linfocitos Th17 y la producción de IL-17 por los mismos (108). También puede encontrarse en linfocitos Tc17, linfocitos T $\gamma\delta$ o células ILC3. Por lo tanto, se trata de una diana farmacológica potencialmente útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunes mediadas por la señalización de IL-17, que bloquearía también las interleuquinas IL-17F, IL-21 e IL-22 (9,109).

Se trata de un receptor nuclear que contiene cuatro dominios, entre los que se encuentran un dominio de unión al ADN y otro de unión a ligandos. En su mecanismo de activación participan moléculas correguladoras u otros ligandos que se unen induciendo un cambio conformacional que resulta en la modificación de la actividad de transcripción de ROR γ t (30,109).

Así pues, se han buscado ligandos inhibidores de ROR γ t que bloqueen la función de los linfocitos Th17 de forma selectiva. Desde 2016, se han descubierto y estudiado distintos inhibidores de ROR γ t y algunos de ellos han llegado a fases clínicas (30,109).

El primer ligando de ROR γ t en ser descrito fue la digoxina, un fármaco indicado en el tratamiento de ciertas arritmias supraventriculares que posee una estrecha ventana terapéutica. Esta inhibe la actividad de ROR γ t y, en consecuencia, la producción de IL-17 por los linfocitos Th17 (110).

SR1001 es un inhibidor de la actividad transcripcional de ROR γ y ROR α , que se ha utilizado como *lead* (ver definición en el apartado 4.2) para proyectos de descubrimiento de fármacos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes relacionadas con los linfocitos Th17 (109,111). En este sentido, SR2211 es un derivado de SR1001 que se une únicamente al dominio de unión a ligandos de ROR γ sin afectar a ROR α (112).

Otro ejemplo de ligando es TMP920, que desplaza a ROR γ t suprimiendo la diferenciación de Th17. Una vez conocida esta actividad, se han diseñado agonistas inversos de ROR γ t, como TMP778, que tiene una potencia y especificidad más altas (109).

A pesar de los datos positivos en los modelos preclínicos, muchas de las primeras moléculas inhibidoras de ROR γ t no superaron las primeras fases de los ensayos clínicos. Las causas de esta interrupción no se conocen en muchos casos, pero es probable que se deba a su mal perfil de seguridad (inhibición de otros tipos de ROR o de ROR γ en células no inmunitarias) o incluso a una baja eficacia. Sin embargo, actualmente se pueden encontrar nuevas moléculas en estudios clínicos hasta en fase II (30,109).

3.4. Terapias dirigidas a la vía de IL-17 en la psoriasis

El marcador de respuesta clínica de la psoriasis más utilizado es el índice PASI, que cuantifica el eritema, el engrosamiento, la extensión y la descamación de las lesiones. En los ensayos clínicos, la puntuación de PASI suele presentarse como un porcentaje de reducción sobre el PASI basal de los pacientes (88).

La introducción de anticuerpos monoclonales anti-TNF α en el tratamiento de la psoriasis supuso una completa transformación de la terapéutica, al disponer de nuevas herramientas de mayor eficacia con respecto a las anteriores, y con menos efectos adversos. Curiosamente, se demostró que parte de la eficacia de los anticuerpos anti-TNF está ligada al bloqueo indirecto de la vía de señalización de IL-17 (91).

De este modo, todos los anticuerpos monoclonales aprobados que bloquean IL-17 o IL-23 han demostrado eficacia clínica en el tratamiento de la psoriasis (**tabla 1**). Así, se ha llegado a alcanzar un PASI 100 entre el 40 y el 80 % de los pacientes (38).

Es el caso de secukinumab, que está aprobado por la EMA y la FDA para el tratamiento de la psoriasis en placas, de moderada a

grave desde 2015. Su eficacia clínica se demostró en numerosos ensayos clínicos, y fue el primer tratamiento en el que los pacientes pudieron alcanzar un PASI 100. Así, en un ensayo de fase III, el 81,6 % de los pacientes tratados con secukinumab alcanzaron un PASI 75 en la semana 12 (101). Se ha visto que secukinumab tiene un inicio de acción terapéutica más rápido que ustekinumab y es superior a este medicamento biológico: en la semana 16 de un ensayo clínico en el que participaron pacientes que no habían sido tratados previamente con fármacos anti-TNF α los pacientes del grupo de secukinumab alcanzaron un PASI 90/100 en un 79/44,3 % frente al 57,6/28,4 % de los pacientes tratados con ustekinumab (102).

De igual forma que secukinumab, ixekizumab está aprobado para el tratamiento de la psoriasis en placas moderada a grave. Con este anticuerpo, los pacientes tratados también pudieron alcanzar un PASI 100 (113). En los ensayos clínicos de eficacia a largo plazo (UNCOVER), se alcanzó un PASI 75 en un 83,6 % de los pacientes, un PASI 90 en el 70,3 % y un PASI 100 en el 48,9 % (103).

Brodalumab ha demostrado su eficacia y seguridad en fases clínicas, y ha permitido alcanzar un PASI 90 a más del 75 % de los pacientes, así como un PASI 100 (114). En ensayos clínicos de fase III (AMAGINE) se comparó su eficacia con ustekinumab, y se vio que el PASI 75 ocurría en el 86 % de los pacientes tratados con brodalumab, frente al 69 % de los tratados con ustekinumab. El PASI 100 se alcanzó en el 44 % del grupo de brodalumab frente al 22 % del de ustekinumab (104).

Recientemente, en un ensayo clínico en fase IIb para psoriasis en placas, se ha visto que hasta el 60 % de los pacientes tratados con bimekizumab durante 12 semanas alcanzaron un PASI 100 (115).

En relación con el bloqueo de la vía de IL-17 a través de IL-23 e IL-12, ustekinumab (también aprobado para el tratamiento de psoriasis por las agencias del medicamento) posee una gran cantidad de datos en cuanto a su buena eficacia clínica y su perfil de seguridad. Además, se ha demostrado que es superior a etanercept

(un inhibidor de $\text{TNF}\alpha$) y se ha visto que su efecto farmacológico es duradero (85,91). Tras un seguimiento de pacientes durante 5 años, el 76 % de ellos superaban un PASI 75 (105).

Guselkumab está aprobado para la psoriasis en placas moderada a grave desde 2017. En ensayos clínicos en fase III mostró una eficacia similar a ustekinumab y adalimumab (un inhibidor de $\text{TNF}\alpha$), de forma que el 74 % de los pacientes alcanzaron un PASI 75 en la semana 16 (91,106).

Tildrakizumab también está aprobado para la psoriasis en placas moderada a grave desde 2018. En un ensayo clínico en fase III de 28 semanas, el 78 % de los pacientes tratados con tildrakizumab alcanzaron un PASI 75, el 58 % un PASI 90 y el 29 % un PASI 100 (107). En otro ensayo en fase III, se comparó un grupo de pacientes tratados con tildrakizumab con otro de tratados con etanercept, en los que el PASI 75/90 fue del 76/57 % frente al 54/34 %, respectivamente (116).

Otro inhibidor de la subunidad p19 de IL-23, risankizumab, mostró eficacia superior a placebo en un ensayo clínico en fase III, donde el 73,2 y el 47,2 % de los pacientes alcanzaron un PASI 90 y un PASI 100, respectivamente. Se aprobó en 2019 para la psoriasis en placas moderada a grave (91).

Actualmente, mirikizumab se encuentra en estudios clínicos en fase II. Se observó que hasta 66,7 % de los pacientes tratados con mirikizumab alcanzaron un PASI 90 (91).

En general, los inhibidores de la subunidad p19 de IL-23 (guselkumab, tildrakizumab, risankizumab, mirikizumab) parecen ser más eficaces que los inhibidores de p40 (como ustekinumab), subunidad compartida con IL-12. Esto se debe, probablemente, al papel central de IL-23 en la patogénesis de la psoriasis, frente a un papel menos específico de la IL-12 en esta enfermedad (91).

Además de los anticuerpos monoclonales que bloquean la vía de IL-17, descritos con anterioridad, existen otros tratamientos que se encuentran en fases de desarrollo. Es el caso de los nanoanticuerpos

(*nanobodies*) diseñados contra IL-17 o IL-23 (117,118). Los anticuerpos biespecíficos para IL-17A y TNF α (como COVA322 y ABT-122) se estaban estudiando para el tratamiento de la psoriasis en fases clínicas. Sin embargo, sus estudios se han interrumpido a causa de problemas de seguridad y ausencia de resultados clínicos positivos relevantes, respectivamente (91).

3.5. Terapias dirigidas a la vía de IL-17 en otras patologías

3.5.1. Artritis psoriásica

La respuesta clínica de la artritis psoriásica se mide con el índice PASI (para la afectación de la piel) y también con el índice ACR (*American College of Rheumatology*), el cual cuantifica el cambio en la actividad de la enfermedad en las articulaciones desde el estado basal (9).

Secukinumab está aprobado para el tratamiento de la artritis psoriásica por la EMA y la FDA, habiendo demostrado su eficacia elevada y sostenida en ensayos clínicos en fase III (FUTURE-1 y FUTURE-2) (99,119). De hecho, ha demostrado ser superior a adalimumab (un inhibidor de TNF α) en el tratamiento de la artritis psoriásica durante un año (120). Además, secukinumab parece ser el tratamiento más eficaz para la dactilitis (99).

De forma similar a secukinumab, ixekizumab está aprobado para el tratamiento de la artritis psoriásica por la EMA y la FDA tras haber demostrado su eficacia. En dos ensayos clínicos en fase III (SPIRIT-P1 y SPIRIT-P2) se alcanzó un PASI 100 en más pacientes (40,7 %) que en los tratados con adalimumab (14,7 %), mientras que el efecto articular (ACR 50) o en uñas fue similar para ambos tratamientos (99,121). Se ha visto que ixekizumab es eficaz en pacientes que no habían respondido adecuadamente a tratamientos previos con anti-TNF α (99)

Brodalumab también es eficaz y seguro para el tratamiento de la artritis psoriásica, para la cual ha sido aprobado por la EMA y la FDA. En un ensayo clínico en fase II durante 12 semanas, se alcanzó un ACR 50 en el 33 % de los pacientes tratados (99,122).

En un estudio clínico de prueba de concepto se vio que bimekizumab tuvo una respuesta eficaz en la piel (PASI 100 en el 73,3 % de los pacientes) y articulaciones (ACR 50 en 56,7 % de los pacientes) de los sujetos tratados con este anticuerpo (115).

Ustekinumab está aprobado para el tratamiento de la artritis psoriásica. Su eficacia se demostró en ensayos clínicos en fase III (como PSUMMIT-1 y PSUMMIT-2), con un índice ACR 50 en el 26,4 % de los pacientes tratados con ustekinumab frente al 8,7 % de pacientes del grupo placebo en la semana 24. En la semana 52 de estos ensayos, el 60,6 % de los pacientes tratados con ustekinumab alcanzaron un PASI 75 y el 43,7 % un PASI 100 (99,123).

Guselkumab parece eficaz en la artritis psoriásica. En un ensayo clínico en fase II, en la semana 24 se alcanzó un ACR 50/70 en el 34/14 % de los pacientes tratados con guselkumab frente al 10/2 % en el grupo placebo, respectivamente. El índice PASI 75/90 se alcanzó en el 79 % y en el 66 % de los pacientes del grupo de guselkumab (99,124).

3.5.2. *Espondilitis anquilosante*

El marcador de respuesta clínica más utilizado para la espondilitis anquilosante es el ASAS (*Assessment of Spondyloarthritis International Society*), que cuantifica el porcentaje de cambio en la actividad de la enfermedad desde el estado basal (9).

Hasta la aprobación de secukinumab por la EMA y la FDA apenas existían opciones terapéuticas de elevada eficacia para el tratamiento de la espondilitis anquilosante (125). En ensayos clínicos en fase III (MEASURE 1 y MEASURE 2) los índices ASAS 20 y 40 se alcanzaron en el 74 y el 57 % de los pacientes tratados con secukinumab durante

52 semanas. Además, estas respuestas se mantuvieron en el tiempo, de forma que en la semana 156, el 70,1 y el 60,9 % de los pacientes alcanzó un ASAS 20 o 40, respectivamente. Asimismo, pacientes que habían sido tratados previamente con anticuerpos anti-TNF α respondieron a la terapia con secukinumab (126,127).

Ixekizumab ha demostrado eficacia en ensayos clínicos en fase III, con respuestas de un 52 % de los pacientes de ASAS 40, frente al 18 % del grupo placebo, en la semana 16 (126).

Existen estudios de bimekizumab en fase II, en el que el 46 % de pacientes tratados con este anticuerpo alcanzaron un ASAS 40, frente al 13 % de los sujetos que estaban en el grupo de placebo (126).

Los datos de eficacia clínica de los pacientes con espondilitis anquilosante tratados con inhibidores de IL-17 contrasta con los datos negativos de aquellos tratados con inhibidores de IL-23. Aunque no se conoce la causa de esta diferencia, se podría atribuir a que la IL-23 tiene un papel importante en el inicio de la patología pero no en su mantenimiento (127).

3.5.3. *Artritis reumatoide*

Los marcadores de respuesta clínica de la artritis reumatoide más frecuentes son el índice ACR y DAS (*Disease Activity Score*) (9).

En un ensayo de 52 semanas, los pacientes que no habían respondido previamente a otros tratamientos de primera línea (metotrexato o biológicos anti-TNF α) lo hicieron con secukinumab (128,129).

De forma similar, pacientes no respondedores a medicamentos biológicos anti-TNF α respondieron a ixekizumab en un ensayo clínico de 16 semanas (130). La continuación de este estudio mostró que las mejoras clínicas observadas con anterioridad se mantuvieron hasta la semana 64 (131).

Sin embargo, los pacientes con artritis reumatoide no responden a brodalumab. Una de las principales razones por las que se podría explicar esta falta de respuesta reside en que la inhibición de IL-25 (IL-17E) sea negativa para alcanzar un balance positivo con el tratamiento (132,133).

Hasta el momento no ha sido aprobado ningún anticuerpo monoclonal dirigido a IL-17 para el tratamiento de la artritis reumatoide. Aunque el bloqueo de esta citoquina parece eficaz en el tratamiento de dicha patología, existe un cierto grado de heterogeneidad en la respuesta de los pacientes a estos tratamientos (secukinumab e ixekizumab), que dificulta la obtención de una respuesta suficientemente eficaz que permita utilizarlos en la práctica clínica (133,134).

3.5.4. Esclerosis múltiple

En el tratamiento de la esclerosis múltiple con anticuerpos dirigidos a la vía de IL-17 hasta el momento solamente se ha probado secukinumab. Su eficacia parece ser superior a la del placebo, de forma que redujo las lesiones determinadas por imagen de resonancia magnética en un 60 %. No obstante, es necesario realizar ensayos más amplios para determinar la utilidad de secukinumab en esta patología (135,136).

3.5.5. Enfermedad inflamatoria intestinal

En los ensayos clínicos con anticuerpos dirigidos a IL-17 y su receptor se observó una eficacia clínica muy baja en la enfermedad de Crohn. Lo más preocupante es que incluso se observó el empeoramiento clínico de los pacientes tratados con secukinumab y brodalumab, lo que llevó a la interrupción de dichos estudios (137,138).

Por el contrario, ustekinumab está aprobado para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, y no presenta los efectos adversos que sí se han observado con el uso de los anticuerpos anti-IL-17. Así, parece que el bloqueo de IL-23 sigue permitiendo un cierto grado de respuesta protectora de IL-17 en la mucosa intestinal, que impedirían secukinumab y brodalumab (9,38).

3.6. Efectos adversos de las terapias dirigidas a la vía de IL-17

Debido al papel de IL-17 en la defensa del organismo contra patógenos extracelulares, el bloqueo de esta citoquina o de su señalización puede resultar en un leve incremento de la frecuencia infecciones (113).

Es el caso de las candidiasis, las cuales son más habituales en los pacientes tratados con secukinumab e ixekizumab que en los pacientes tratados con etanercept (101,139). De hecho, esto se ha observado en ensayos clínicos agrupados donde se analiza la seguridad de secukinumab tras un año de tratamiento (140). Sin embargo, estas infecciones por *Candida* no son graves y no suelen suponer la interrupción del tratamiento con estos anticuerpos (85).

Otros efectos adversos frecuentes de los tratamientos con anticuerpos que bloquean la vía de IL-17 son las infecciones de las vías respiratorias altas, nasofaringitis, diarrea, artralgia o cefalea, así como las reacciones en el lugar de inyección (85,113,139,141). Pese a que no es excesivamente frecuente (menor al 5 % de frecuencia), en algunos pacientes se describe neutropenia (115,124).

Uno de los efectos adversos más graves que se observó con el uso de brodalumab fue la aparición de ideación suicida en algunos pacientes, que incluso llegó a parar temporalmente los ensayos clínicos (142). No obstante, en un estudio con casi 4500 pacientes se demostró que no existe una asociación clara entre el tratamiento con brodalumab y la ideación suicida (143).

Debido al papel protector de IL-17 en la integridad de la barrera mucosa intestinal, su bloqueo puede suponer un problema en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Así, los tratamientos con anticuerpos anti-IL-17 no deben utilizarse en pacientes con psoriasis o artritis psoriásica que también sufran la enfermedad de Crohn (85).

4. MOLÉCULAS PEQUEÑAS TERAPÉUTICAS DIRIGIDAS A LAS INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA

4.1. La necesidad de moléculas pequeñas

El éxito clínico de los fármacos biológicos (entendidos como proteínas de fusión y anticuerpos terapéuticos) ha revolucionado el arsenal terapéutico para muchas enfermedades, entre las que se encuentran las autoinmunes. A pesar de la introducción de los medicamentos anti-TNF α , anti-IL-12/IL-23 y anti-IL-17 en el tratamiento de la psoriasis, estos no son suficientes para abordar las necesidades terapéuticas no cubiertas (109).

En general, los fármacos biológicos se toleran bien y tienen un buen perfil de toxicidad a largo plazo. Algunos de los efectos adversos más relevantes incluyen el incremento del riesgo de infecciones, de desarrollar determinados tipos de neoplasias o cambios hematológicos como la neutropenia (109,144,145).

De esta manera, la limitación principal en el uso de fármacos biológicos no es su seguridad, sino su eficacia. Pese a que en la mayoría de los pacientes se mantiene a lo largo de los años, en hasta el 25 % de los pacientes se produce una pérdida de eficacia, que parece ser un fenómeno estocástico. Así, es la causa principal de la interrupción del tratamiento con este tipo de medicamentos (junto con la ausencia total de eficacia o una eficacia insuficiente), seguida

por la remisión de la patología y, por último, los efectos adversos (145–150).

La mencionada pérdida de la eficacia de los fármacos biológicos puede deberse a distintos factores. Entre estos factores se encuentran: la inducción de anticuerpos anti-fármaco; la inducción de otras citoquinas proinflamatorias, que se producirían como mecanismo compensatorio de la reorganización del sistema inmunitario al encontrarse neutralizada la función de una de ellas; la variabilidad interindividual en el metabolismo de los fármacos, o incluso el sexo del paciente (145,151).

De todos los factores que pueden influir en la pérdida de eficacia de los fármacos biológicos destaca la presencia de anticuerpos anti-fármaco, que neutralizan al anticuerpo terapéutico o modifican su farmacocinética. Esta capacidad de los fármacos biológicos para generar una respuesta inmunitaria se conoce como inmunogenicidad (147,150). Si los anticuerpos anti-fármaco tienen como epítipo el lugar de unión del antígeno se consideran anti-fármacos neutralizantes, que favorecerían de forma directa la pérdida de eficacia del fármaco biológico. Los anticuerpos no neutralizantes tendrían un papel importante al facilitar la eliminación del fármaco mediante la formación de un inmunocomplejo (147).

Entre los factores que influyen en la inmunogenicidad de los fármacos biológicos se encuentra su posología, la susceptibilidad genética del paciente, la actividad de la enfermedad e incluso infecciones que desencadenen una respuesta inmunitaria. Asimismo, la exposición previa del paciente a otros agentes biológicos facilita que se produzcan anticuerpos anti-fármaco, que obstaculizarían la eficacia del siguiente tratamiento con otro anticuerpo terapéutico (145,147).

Así pues, existen limitaciones en el uso de fármacos biológicos debidas a la pérdida de eficacia que ocurre en un porcentaje significativo de los pacientes tratados. Además, el elevado coste de estos tratamientos tiene como consecuencia que no se puedan utilizar como primera línea de tratamiento, a pesar de su buen perfil

de seguridad (147). Por consiguiente, el descubrimiento de moléculas pequeñas dirigidas a las dianas moduladas por los fármacos biológicos podría ampliar las opciones terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes.

4.2. Los retos en la identificación de moléculas pequeñas para las interacciones proteína-proteína

Las interacciones proteína-proteína median muchos procesos biológicos y, en consecuencia, están implicadas en procesos patológicos. Debido a esto se consideran dianas terapéuticas relevantes (152–154).

A diferencia de las dianas farmacológicas tradicionales, son más difíciles de alterar con moléculas pequeñas y, por lo tanto, sigue siendo un reto encontrar inhibidores de las interacciones proteína-proteína. Esto es debido a que no poseen bolsillos bien definidos para la unión de ligandos de bajo peso molecular, sino que la interacción entre proteínas se produce entre dos superficies amplias y generalmente planas. De hecho, estas áreas de interacción se extienden entre 1500 y 6000 Å², frente a las cavidades donde se suelen unir las moléculas pequeñas, de unos 300 a 500 Å². Las interacciones proteína-proteína suelen estar constituidas por aminoácidos principalmente hidrofóbicos (152,155,156).

No obstante, en las superficies de interacción proteína-proteína se encuentran lo que se denominan “*hotspots*”. Son residuos clave en la unión entre proteínas, ya que contribuyen en mayor medida a la energía libre de la unión entre proteínas que el resto de áreas de las mismas. Normalmente, estos residuos se agrupan en regiones críticas, cuya superficie es más pequeña que la total en la interacción proteína-proteína, de forma que suponen alrededor de un 10 % de los aminoácidos totales de la superficie de interacción. Además, durante la unión de ligandos a las proteínas de una interacción proteína-proteína se abren una serie de bolsillos transitorios, lo cual es

indicativo de la flexibilidad y plasticidad de estas uniones (152,153,155–157).

Las interacciones proteína-proteína pueden clasificarse en distintos tipos dependiendo de la amplitud de la superficie de interacción, de si son homodiméricas o heterodiméricas y de la afinidad de la unión entre proteínas, que puede variar desde el rango picomolar hasta el rango alto micromolar. Las parejas de proteínas que se unen entre sí con mayor afinidad suelen ser las más fáciles para el diseño de moléculas pequeñas, así como aquellas que se producen entre una proteína globular y un péptido pequeño. Curiosamente, las interacciones entre dos péptidos son más difíciles de alterar por ligandos pequeños debido a la falta de un lugar de unión concreto, así como al cambio conformacional de los mismos que se puede producir cuando ocurre esta unión (152,155,156,158).

Para estudiar las interacciones proteína-proteína e identificar ligandos de bajo peso molecular que las alteren es necesario conocer las estructuras de dichas proteínas, así como sus *hotspots*. De ser posible, lo ideal es estudiar distintas conformaciones de la proteína libre o unida a diversos ligandos (155).

Así, encontrar moléculas pequeñas con características de fármacos, es decir, candidatas, sería el primer objetivo del proceso de descubrimiento de fármacos dirigidos a bloquear estas interacciones proteína-proteína. Estas moléculas candidatas progresarían a una fase preclínica y, en caso de superarla con éxito, serían comercializadas como fármacos de uso humano. Este proceso comienza con la identificación de *hits* tras un cribado para una diana determinada, es decir, moléculas con la actividad deseada. Posteriormente, un *hit* (o una serie de *hits*) se valida biológicamente y se optimiza químicamente para que pueda ser más selectivo y más potente: se convierte en un *lead*. También se mejoran sus propiedades físico-químicas y, por consiguiente, su farmacocinética, de forma que sea la ideal para poder evaluar su eficacia *in vivo* (159,160).

En el caso de las interacciones proteína-proteína, existen distintas estrategias para identificar moléculas pequeñas que las inhiban. La biología estructural, los ensayos biofísicos y los análisis computacionales tienen un papel fundamental en la investigación de las interacciones proteína-proteína y, por lo tanto, en la identificación de inhibidores de las mismas (155,156).

Entre las estrategias de identificación de moléculas pequeñas para interacciones proteína-proteína se encuentra el cribado de fragmentos moleculares, es decir, moléculas pequeñas de poca complejidad que se unen a alguna región superficial de la proteína. El cribado de fragmentos posee normalmente un mejor rendimiento en la identificación de *hits* que el cribado de alto rendimiento clásico, cuyas quimiotecas están diseñadas basándose en el conocimiento del conjunto de todas las dianas convencionales y, por lo tanto, tienen ese sesgo de diversidad.

Para llevar a cabo el cribado de fragmentos se emplean métodos biofísicos como NMR (espectroscopía de resonancia magnética nuclear), cristalografía de rayos X, SPR (resonancia de plasmones superficiales) o fluorometría diferencial de barrido (152,155,156). Un ejemplo de éxito en la identificación de ligandos para las interacciones proteína-proteína a partir del cribado de fragmentos moleculares fue la identificación de inhibidores de Bcl-2, que en 2016 se aprobaron como antitumorales para su uso en clínica (153).

Con el objetivo de identificar moléculas pequeñas para interacciones proteína-proteína se han aplicado estrategias basadas en el diseño de estructuras químicas que mimeticen las interacciones en los *hotspots*. Es el caso del diseño racional de péptidos, que poseen limitaciones en su aplicación clínica por su dificultad en la permeabilidad de la membrana celular y su inestabilidad metabólica. Sin embargo, suponen una estrategia paralela que puede ayudar al diseño de moléculas pequeñas (152,153,155,156).

Las técnicas computacionales permiten complementar los ensayos de cribado y llevar a cabo los diseños racionales, así como identificar potenciales bolsillos de unión (156,161). Un ejemplo de un

método computacional basado en la estructura de la proteína es el *docking*, que permite puntuar las moléculas y seleccionar así las que posean una buena afinidad de unión (155).

En la identificación de ligandos para inhibir interacciones proteína-proteína destaca el uso de macrociclos. Son moléculas con un peso molecular entre unos 500 a 2000 Da, de mayor tamaño que las moléculas pequeñas convencionales. Su superficie de interacción con las proteínas puede ser comparable a la de los anticuerpos o la que se produce entre dos proteínas. Son específicos de su diana, no son inmunogénicos y, a diferencia de los péptidos, poseen estabilidad metabólica. No obstante, presentan limitaciones en su síntesis y en la permeabilidad de membranas celulares, aunque se ha logrado biodisponibilidad por vía oral con la mejora de estas propiedades. Además, se han conseguido sintetizar librerías químicas de macrociclos (162,163).

Para el descubrimiento de macrociclos que alteren interacciones proteína-proteína se han utilizado distintas estrategias. Es el caso de *phage display*, una técnica que emplea secuencias de péptidos insertadas en el genoma de un bacteriófago, de forma que se codifican péptidos de fusión con proteínas de la envuelta del fago (162,164).

También se han empleado con éxito quimiotecas codificadas por ADN (DEL, *DNA-encoded library*). En estas quimiotecas, cada bloque químico está unido covalentemente a una secuencia de ADN que actúa como código de barras para identificar cada una de las moléculas presentes en la librería. Esto permite determinar los ligandos a través de secuenciación de ADN después de realizar selecciones por cromatografía de afinidad frente a una diana (162,165). Se trata de una de las estrategias más versátiles para aplicar al descubrimiento de fármacos y a los estudios de mecanismo de acción (166). De hecho, se ha aplicado recientemente a la IL-17A con un éxito relativo (167).

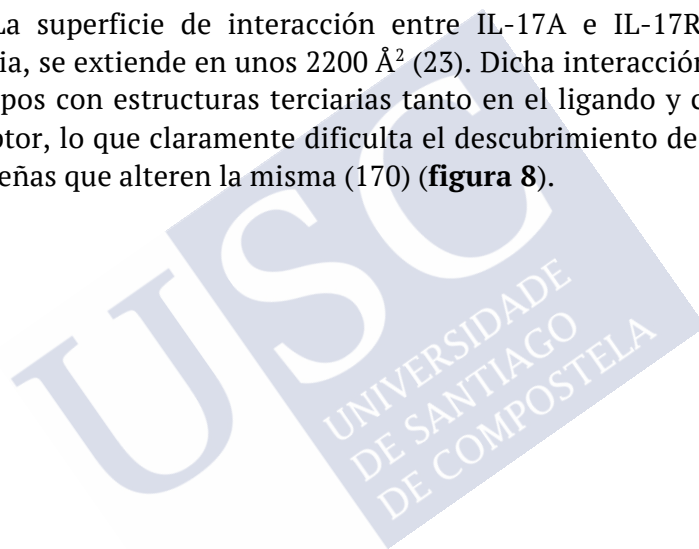
Otra de las estrategias utilizadas en la identificación de macrociclos es la *diversity-oriented synthesis* (DOS). Esta permite

expandir el espacio químico al generar quimiotecas con estructuras químicas basadas en productos naturales (162,168). Un ejemplo muy interesante es la integración de las metodologías DEL y DOS para preparar librerías con diversidad estereoquímica (169).

4.3. La interacción proteína-proteína entre IL-17A e IL-17RA como diana terapéutica

Hasta el momento, las únicas herramientas terapéuticas disponibles para inhibir la vía de IL-17 son anticuerpos monoclonales. Esto se debe principalmente a que IL-17 es una citoquina y, por lo tanto, su unión al receptor es una interacción proteína-proteína.

La superficie de interacción entre IL-17A e IL-17RA es muy amplia, se extiende en unos 2200 Å² (23). Dicha interacción implica a epítopos con estructuras terciarias tanto en el ligando y como en el receptor, lo que claramente dificulta el descubrimiento de moléculas pequeñas que alteren la misma (170) (**figura 8**).



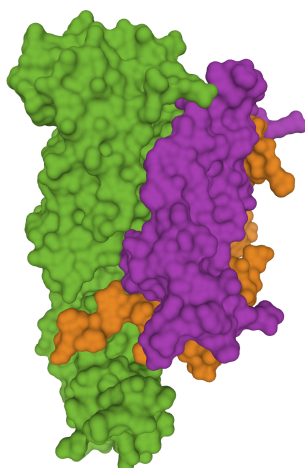


Figura 8. Estructura cristalina del homodímero IL-17A en complejo con IL-17RA. Se representa el homodímero (púrpura y naranja) junto con IL-17RA, en verde. Estructura 4HSA extraída de PDB (Protein Data Bank) (23).

En el homodímero de IL-17A se han identificado tres regiones clave para la interacción con IL-17RA. La región I es una hélice alfa en el área N-terminal (residuos 60-62, 99, 101, 110) y la región II es el bolsillo horquilla beta (residuos 93-95), ambas interaccionan con el dominio D1 de IL-17RA. La región I es la que posee los aminoácidos menos conservados entre las citoquinas de la familia de IL-17. Ambas regiones se consideran bolsillos “*druggable*”, es decir, que tienen la capacidad de unir potenciales fármacos. Una tercera región (región III), en el área C-terminal, contacta con el dominio D2 de IL-17RA (23,171).

Tal y como se explicó con anterioridad, para facilitar el descubrimiento de moléculas pequeñas que alteren una interacción proteína-proteína es útil identificar sus *hotspots* (157). En el caso de IL-17A se ha empleado la técnica de *phage-display*, que permitió identificar dos péptidos que se unen a las regiones de interacción I y II de IL-17A con IL-17RA (170).

Además de los péptidos mencionados, se ha descubierto otro péptido de alta afinidad por IL-17A. De forma similar a lo descrito anteriormente, se ha identificado mediante *phage-display* y estudios de relación estructura-actividad (*structure-activity relationship*, SAR). Dicho péptido se une a la región I de la superficie de interacción IL-17A con su receptor y produce un cambio conformacional en la citoquina dificultando y, además, compitiendo con IL-17RA por la unión a IL-17A. Asimismo, se ha demostrado su actividad inhibitoria de la inflamación inducida por IL-17A y TNF α en queratinocitos humanos. Así pues, este péptido puede emplearse como herramienta farmacológica para la identificación de moléculas pequeñas que interrumpan el complejo entre IL-17A/IL-17RA (172) (**figura 9**).

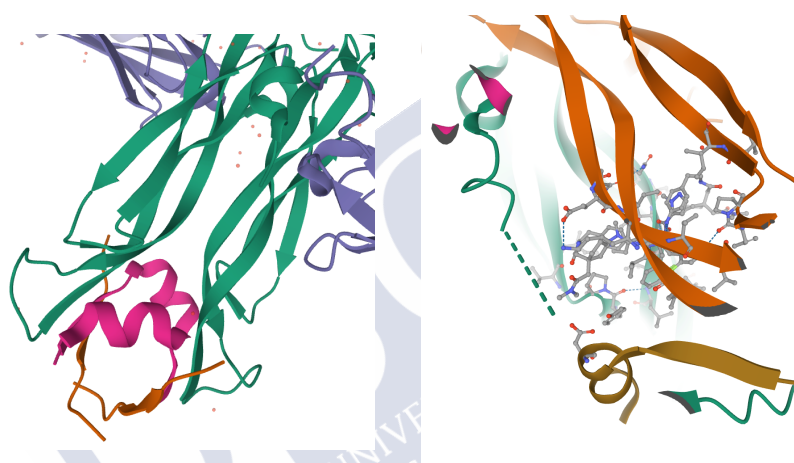


Figura 9. Estructura cristalina del homodímero IL-17A con un péptido y un macrociclo. A la izquierda se representa el homodímero al que está unido un péptido (rosa). A la derecha, se encuentra la unión de un macrociclo. Estructuras 5HHV (172) y 5HI3 (173) extraídas de PDB (Protein Data Bank).

En este sentido, se han descubierto varios macrociclos artificiales que antagonizan la interacción proteína-proteína entre IL-17A e IL-17RA (174) (**figura 9**).

El primer macrociclo descrito para IL-17A/IL-17RA se descubrió mediante el uso de quimiotecas DEL. Se describió que inhibía la formación del complejo IL-17A/IL-17RA en un ensayo de ELISA, además de poseer una actividad inhibidora de IL-17A en un ensayo con células HT-29 (inhibición de la liberación de CXCL1), y parecía eficaz en modelos *in vivo* (171,174).

Posteriormente se describió la región de IL-17A a la que se une el macrociclo, molécula que producía cambios conformacionales en la citoquina. Para ello se empleó una combinación de estudios computacionales y espectrometría de masas de intercambio hidrógeno-deuterio (HDX-MS, *hydrogen-deuterium exchange mass spectroscopy*). Esta técnica biofísica permite caracterizar las dinámicas proteicas tras la unión de un ligando (171,174).

Asimismo, se diseñaron otros macrociclos y se co-cristalizaron con IL-17A en alta resolución. Este grupo de moléculas se une al bolsillo central del homodímero de IL-17A, que está implicado en la unión con IL-17RA. En esta área de la proteína las secuencias de aminoácidos no están conservadas exactamente en todas las interleuquinas de la familia de IL-17, por lo que los macrociclos son específicos para IL-17A. Para facilitar la mencionada cristalización utilizaron un Fab (fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo). Estos macrociclos mostraron una actividad inhibitoria de IL-17A en un ensayo con queratinocitos (173,174).

A pesar de todos estos avances en el descubrimiento de moléculas dirigidas al complejo IL-17A/IL-17RA, hasta el momento no se conoce la utilización de ningún macrociclo en ensayos clínicos.

Así pues, se podrían diseñar moléculas pequeñas que interaccionen con el complejo proteico IL-17A/IL-17RA, de forma que se evite su asociación y, por lo tanto, la señalización de esta vía proinflamatoria. Además, a diferencia de los fármacos biológicos, la administración de las moléculas pequeñas se llevaría a cabo mediante la vía oral (173).



ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

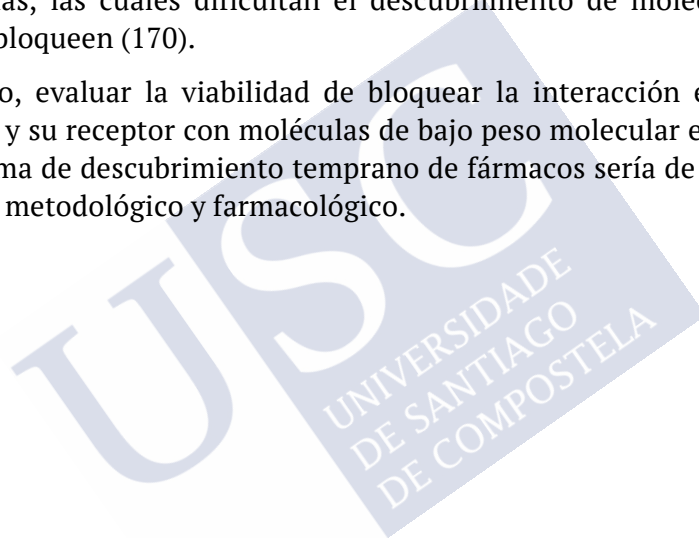


ANTECEDENTES

- La interleuquina 17A (IL-17A) es una citoquina proinflamatoria que desempeña un papel central en la defensa contra patógenos extracelulares en las mucosas y epitelios (6). Durante la respuesta inmunitaria la IL-17A liberada desde las células efectoras estimula la expresión de mediadores de la inflamación como citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, metaloproteinasas de la matriz o proteínas antimicrobianas en sus células diana. Estas son principalmente células no hematopoyéticas que expresan el receptor IL-17RA/IL-17RC (26,38,49,50).
- Pese a su papel como mediador de respuestas inmunitarias en la defensa contra patógenos extracelulares, una producción excesiva y crónica de IL-17A en el organismo se relaciona con la patogénesis de distintas enfermedades autoinmunes (9,21). Es el caso de la psoriasis, una enfermedad inflamatoria crónica de la piel que afecta entre un 2 y un 3 % de la población mundial (80,81).
- En las lesiones de pacientes con psoriasis se han encontrado niveles elevados de IL-17A y citoquinas relacionadas con los linfocitos Th17 (como IL-22 e IL-23) e (90). Así, el bloqueo de la vía inflamatoria de IL-17 con anticuerpos neutralizantes dirigidos a IL-17A (secukinumab e ixekizumab) y el receptor IL-17RA (brodalumab) es eficaz en el tratamiento de la psoriasis, y ha permitido validar esta diana terapéutica en la clínica (38,98).
- Sin embargo, estos medicamentos biológicos no son suficientes para abordar las necesidades terapéuticas no cubiertas en la psoriasis (109). Pese a que presentan un buen perfil de seguridad, en un 25 % de los pacientes se produce una degradación del fármaco en el organismo, que puede ir asociada a una pérdida de eficacia. Además, el elevado coste de estos tratamientos tiene

como consecuencia que no se puedan utilizar como primera línea de tratamiento, que requiere el uso de una vía de administración parenteral, ya que los anticuerpos carecen de biodisponibilidad oral (147,175). Por consiguiente, el descubrimiento de moléculas pequeñas dirigidas a las dianas moduladas por los fármacos biológicos podría ampliar las opciones terapéuticas para el tratamiento de la psoriasis.

- No obstante, conseguir moléculas de bajo peso molecular que alteren la interacción entre IL-17A y su receptor supone un enorme reto. Esto se debe a que se trata de una interacción proteína-proteína, la cual carece de sitios de unión bien definidos para ligandos de bajo peso molecular y se produce entre dos superficies amplias y generalmente planas, de unos 2200 Å² (23). Este tipo de interacción implica a epítomos con estructuras terciarias, las cuales dificultan el descubrimiento de moléculas que la bloqueen (170).
- Por ello, evaluar la viabilidad de bloquear la interacción entre IL-17A y su receptor con moléculas de bajo peso molecular en un programa de descubrimiento temprano de fármacos sería de gran interés metodológico y farmacológico.



HIPÓTESIS

La interacción entre las proteínas IL-17A e IL-17RA podría ser modulada farmacológicamente por nuevos ligandos de bajo peso molecular identificados mediante la aplicación de un programa de descubrimiento temprano de fármacos.

OBJETIVOS

- 1. Identificar ligandos de bajo peso molecular con afinidad por la interacción entre IL-17A e IL-17RA.**
 - 1.1. Generar una quimioteca focalizada mediante un cribado virtual para identificar moléculas que se unan a IL-17A/IL-17RA.
 - 1.2. Realizar un cribado primario de los ligandos IL-17A/IL-17RA identificados mediante ensayos biofísicos.
 - 1.3. Caracterizar la interacción molecular entre los ligandos e IL-17A/IL-17RA.
- 2. Evaluar la eficacia antiinflamatoria de los ligandos en respuesta a la estimulación con IL-17A.**
 - 2.1. Estudiar la inhibición de la liberación de la quimioquina inflamatoria CXCL1 en células tumorales de colon.
 - 2.2. Estudiar la inhibición de la liberación de las quimioquinas CCL20 e IL-8 en queratinocitos humanos.

2.3. Estudiar la influencia de los ligandos sobre la expresión de *CCL20* y *CXCL8* en queratinocitos humanos.

3. Caracterizar el efecto de los ligandos sobre la señalización intracelular del receptor de IL-17A en queratinocitos humanos.

3.1. Estudiar el efecto de los ligandos sobre la cascada inflamatoria de NF- κ B en queratinocitos.

3.2. Estudiar el efecto transcripcional de los ligandos sobre C/EBP β .

3.3. Estudiar el efecto postranscripcional de los ligandos sobre Regnasa-1 (ZC3H12A).





MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1. Reactivos y tampones

1.1.1. *Material empleado en el cultivo de líneas celulares*

- Medio DMEM Glutamax™ (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*): Gibco referencia (ref) 31966.
- Suero fetal bovino (FBS): Sigma Aldrich ref F9665.
- Penicilina-estreptomicina (100 µg/ml y 100 UI/ml): Sigma Aldrich ref P0781.
- Medio McCoy's 5A: ATCC ref 30-2007.
- DMSO (dimetilsulfóxido): Sigma Aldrich.
- Tripsina-EDTA: Sigma Aldrich ref T3924.
- Poli-D-lisina: Sigma Aldrich ref P6407.

Tampón de lavado:

- PBS (tampón fosfato salino): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 2 mM. Reactivos de Sigma Aldrich.

1.1.2. Material empleado en la expresión de proteínas recombinantes humanas

- Bacterias competentes de alta eficiencia *E. coli* DH5 α y medio SOC (caldo superóptimo con represión por catabolito): New England Biolabs ref C2987H.
- NucleoBond® Xtra Midi EF: Macherey-Nagel ref 740410.
- Isopropanol: Sigma Aldrich.
- Polietilenimina (PEI): Sigma Aldrich.
- Opti-MEM®: Gibco ref 11058021.
- Freestyle™ 293 Expression Medium: Gibco ref 12338018.
- Amicon-15 3 kDa: Merck Millipore ref UFC900308.
- HisTrap FF Crude de 5 ml: GE Healthcare ref 11000458.
- Pur-A-Lyzer™ Maxi Dialysis Kit MWCO 3.5 kDa: Sigma Aldrich ref PURX35015.
- Columna HiTrap Desalting: GE Healthcare ref 29048684.

Medio de crecimiento de bacterias:

- Luria-Bertani (LB): 1 % de triptona bacteriológica (Intron Biotechnology), 0,5 % de extracto de levadura (Affymetrix) y 1 % de NaCl (Sigma Aldrich).
- Agar (6 g/l): Panreac.
- Ampicilina: Sigma Aldrich.

Tampones para la purificación de proteínas recombinantes:

- Tampón de lavado: sodio fosfato 20 mM pH 7,4, con 500 mM de NaCl y 25 mM de imidazol (reactivos de Sigma Aldrich).
- Tampón de elución: sodio fosfato 20 mM pH 7,4, con 500 mM de NaCl y 500 mM de imidazol.

- Tampón de diálisis: sodio fosfato 20 mM pH 7,4 con 150 mM de NaCl.

1.1.3. *Material empleado en la técnica de Western blot*

- DC™ Protein Assay: Bio-Rad ref 5000112.
- Gel Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Plus: Invitrogen ref NW04122BOX.
- BOLT™ LDS 4X: Invitrogen ref B0007.
- Bolt™ MES SDS: Invitrogen ref B0002.
- Immun-Blot® PVDF Membrane: Bio-Rad ref 1620177.
- Metanol: Sigma Aldrich.
- BSA libre de ácidos grasos (BSA): Sigma Aldrich ref 10775835001.
- Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent: GE Healthcare ref RPN2109.
- Revelador y fijador GBX: Carestream Kodak®.
- Amersham Hyperfilm ECL: GE Healthcare ref 28906836.

Tampones:

- Tampón de lisis: 1 ml de tampón RIPA (*radioimmunoprecipitation assay buffer*) con un 1 % de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonio), un 1 % de ortovanadato de sodio, un 1 % del cóctel de inhibidores de proteasas (todos obtenidos de Santa Cruz Biotechnology ref sc-24948), y un comprimido de inhibidores de fosfatasas PhosSTOP™ (Sigma Aldrich ref 4906845001) por cada 10 ml de tampón de lisis.
- Tampón de transferencia Towbin modificado: metanol al 20 %, Tris 20 mM y glicina 150 mM, pH 8. Reactivos de Sigma Aldrich.

- Tampón de lavado: suero tamponado con Tris complementado con Tween 20 al 0,1 % (TBS-T). Reactivos de Sigma Aldrich.

Anticuerpos:

- Anticuerpo primario anti-IL17A de conejo: Sigma Aldrich ref HPA052258.
- Anticuerpo primario anti NF- κ B p65 (#D14E12) de conejo: Cell Signaling Technology ref 8242.
- Anticuerpo primario anti fosfo-NF- κ B p65 (Ser536) (#93H1) de conejo: Cell Signaling Technology ref 3033.
- Anticuerpo primario anti I κ B α (#L35A5) de ratón: Cell Signaling Technology ref 4814.
- Anticuerpo primario anti fosfo-I κ B α (Ser32) (#14D4) de conejo: Cell Signaling Technology ref 2859.
- Anticuerpo secundario ligado a peroxidasa de rábano (HRP): Cell signaling Technology ref 7074.
- Anticuerpo secundario anti-ratón ligado a peroxidasa de rábano (HRP): Cell signaling Technology ref 7076.
- Anticuerpo anti-tubulina ligado a HRP: Abcam ref ab205790.

1.1.4. *Material empleado en ensayos biofísicos*

- EnSpire-LFB® biochemical assay microplate: Perkin Elmer ref 6057468.
- EDC 400 mM (hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida): Sigma Aldrich.
- Sulfo-NHS 100 mM (N-hidroxisulfosuccinidima): Thermo Fisher y Sigma Aldrich.
- IL-17RA ECD Fc: Sino Biological ref 10895-H03H.

- Chip sensor Series S CM5: GE Healthcare ref 29104988.
- Hidrocloruro de etanolamina: Sigma Aldrich.

Tampones:

- Tampón de activación: EDC 400 mM (hidrocloruro de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida) y sulfo-NHS 100 mM (N-hidroxisulfosuccinidima). Reactivos de Sigma Aldrich y Thermo Fisher.
- Tampones de inmovilización con citrato de sodio 20 mM, pH 4 y pH 6: Sigma Aldrich.
- Tampones de inmovilización con acetato de sodio 20 mM, pH 5 y pH 5,5: Sigma Aldrich.
- Tampones de inmovilización con fosfato de sodio 20 mM, pH 7: Sigma Aldrich.
- Tampón de ensayo: PBS con 0,005 % de Tween 20, pH 7,4. Reactivos de Sigma Aldrich.
- Tampón de migración: HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinaetansulfónico) 20 mM, NaCl 200 mM y Tween-20 al 0,05 %, pH 7,4 con un 3 % de DMSO. Reactivos de Sigma Aldrich.

1.1.5. *Material empleado en inmunoensayos de citoquinas*

- Placa de 96 pocillos transparente estéril tratada para cultivo celular: Life Sciences ref 353072.
- IL-17A humana recombinante: Sigma Aldrich ref SRP3080.
- Human ProcartaPlex® Simplex kit CXCL1, CCL20, IL-8: Invitrogen ref EPX01A-12122-901, EPX01A-12128-901, EPX01A-10204-901.
- TNF α : R&D Systems ref 210-TA.

1.1.6. Material empleado en ensayos de microscopía

- Placa de 96 pocillos CellCarrier-96 Ultra negra con el fondo transparente: Perkin Elmer ref 6055302.
- Paraformaldehido (PFA): Sigma Aldrich.
- Anticuerpo primario de conejo anti citoqueratina-17 (#EP1623): Abcam ref ab109725.
- Anticuerpo secundario de cabra anti-conejo Alexa Fluor® 647: Abcam ref ab150083.
- Hoechst 33342: Thermo Fisher ref H3570.
- Phalloidin Atto Alexa Fluor® 565: Sigma Aldrich ref 94072.
- Tritón X-100: Sigma Aldrich ref T8787.

Tampones

- Tampón de bloqueo: PBS con el 0,1 % de Tween 20 (PBS-T), BSA al 1 % y glicina a 22,52 mg/ml. Reactivos de Sigma Aldrich.
- Tampón de dilución de anticuerpos: PBS-T con BSA al 1 %.

1.1.7. Material empleado en ensayos expresión genética de proteínas

- Placa de 6 pocillos transparente estéril tratada para cultivo celular: Life Sciences ref 353046.
- RNeasy Mini Kit: Qiagen ref 74104.
- EXPRESS One-Step SuperScrip® RT-qPCR: Invitrogen ref 11781200. Contiene: la transcriptasa inversa SuperScript® III, el inhibidor de ribonucleasas RNaseOUT™, la ADN polimerasa Platinum® Taq, MgCl₂ (cofactor de la

polimerasa), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), uracil ADN glucosilasa (UDG), agentes estabilizadores y rodamina X (ROX).

- Sondas Taqman®: *36B4* marcada con VIC™ (que codifica la proteína *36B4*); *CCL20* (Hs00355476_m1), *CXCL8* (Hs00174103_m1), *CEBPB* (Hs00270923_s1) y *ZC3H12A* (Hs00962356_m1), todas ellas marcadas con amidita de fluoresceína (TAM), de Thermo Fisher.
- MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate: Thermo Fisher ref 4346907.
- Lámina adhesiva MicroAmp™ Optical Adhesive Film: Thermo Fisher ref 4311971.

1.2. Equipos

- Espectrofotómetro de microvolúmenes NanoDrop™ 2000: Thermo Fisher.
- Sistema de cromatografía ÄKTA™ Start: GE Healthcare.
- EnSpire® Multilabel Plate Reader 2300: Perkin Elmer.
- Multidrop™ 384 Combi: Thermo Scientific.
- Microplate washer 405™-TS washer: Biotek.
- Biacore S200 SPR: GE Healthcare.
- MAGPIX® Luminex®: Luminex Corporation.
- QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System: Life Technologies.
- Operetta™: Perkin Elmer.

MÉTODOS

2. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Todas las líneas celulares empleadas se cultivaron en superficies preparadas para facilitar su adhesión y en presencia de los medios que se detallan a continuación. Se mantuvieron en condiciones controladas de presión de CO₂ del 5 %, de temperatura de 37 °C y del 95 % de humedad relativa.

2.1. Línea celular HEK 293

Las células HEK 293 se obtuvieron a partir de células embrionarias procedentes de riñón fetal humano (*Human Embryonic Kidney*) del laboratorio de Alex van der Eb in Leiden (Países Bajos). Dichas células se modificaron genéticamente mediante la transfección de ADN de adenovirus 5 que se incorporó en el cromosoma 19 humano (176). Pese a su complicado origen (ya que estas células tienen características de endotelio, epitelio, fibroblasto e incluso neurona) y cariotipo (múltiples copias de cromosomas), se trata de un modelo muy utilizado. Esto se debe a que su crecimiento es rápido y su cultivo y mantenimiento son sencillos, además de que la expresión de proteínas y su transfección son reproducibles. Para los experimentos de transfección y expresión de proteínas, las células se cultivaron en medio DMEM Glutamax™ complementado con un 10 % de suero fetal bovino y un 1 % de penicilina-estreptomicina.

2.2. Línea celular HT-29

Las HT-29 son células aisladas de un tumor primario humano de adenocarcinoma de colon (177). Del mismo modo que las células HEK 293, tienen un cariotipo complejo, son positivas para muchos oncogenes y variantes genéticas características en el cáncer, responden a estímulos inflamatorios y poseen mecanismos asociados a la señalización de IL-17 (178). Para los estudios de liberación de citoquinas, las células se cultivaron en medio McCoy's 5A complementado con un 10 % de suero fetal bovino y un 1 % de penicilina-estreptomicina.

2.3. Línea celular HaCaT

Las células HaCaT son queratinocitos monoclonales humanos adultos inmortalizados de forma espontánea que, por lo tanto, crecen sin necesidad de exponerlos a factores de crecimiento. Además, expresan los principales marcadores de superficie y llevan a cabo las actividades funcionales propias de queratinocitos primarios aislados (179). La reproducibilidad de la respuesta celular en las células HaCaT es mayor que la de los queratinocitos humanos aislados de diferentes individuos, y sus características de proliferación y de conservación de la capacidad de diferenciación a queratinocitos hacen que sean un modelo ideal para estudios funcionales (180). Para los estudios de liberación de citoquinas y señalización intracelular, se cultivaron en medio DMEM Glutamax™ complementado con un 10 % de suero fetal bovino y un 1 % de penicilina.

2.4. Descongelación celular

El vial de criogenización con una suspensión celular de 1×10^6 células en FBS complementado con un 10 % de DMSO conservado en

nitrógeno líquido se descongeló en un baño termostatzado a 37 °C y se diluyó en el medio de cultivo de la línea celular correspondiente. Las células se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos y se sembraron en un matraz de cultivo celular de 75 cm² para su posterior expansión.

2.5. Expansión celular

Se procedió a la expansión del cultivo celular cuando la densidad de células alcanzó un 75 – 90 % de confluencia. Las células adheridas al recipiente de cultivo se lavaron con PBS y se añadió un volumen de 2 ml de tripsina-EDTA para provocar la lisis proteica de las uniones entre la membrana y la superficie de cultivo, tras lo cual se incubaron 5 minutos. Posteriormente, se neutralizó la digestión enzimática con el medio de cultivo correspondiente y se recogieron las células para ser cultivadas en uno o varios recipientes con el objetivo de tener la cantidad de células necesaria para los estudios correspondientes.

2.6. Criopreservación celular

La criopreservación celular se llevó a cabo cuando los cultivos celulares alcanzaron una confluencia de alrededor del 75 %. Las células adherentes se lavaron con PBS y se añadió tripsina-EDTA para la proteólisis, tras lo que se incubaron 5 minutos. Posteriormente, se neutralizó la acción de este agente con el medio de cultivo correspondiente y se centrifugaron las células a 1000 g durante 5 minutos.

El sedimento celular se resuspendió en FBS complementado con un 10 % de DMSO y se añadió a un vial de criogenización que se introdujo en un contenedor Mr. Frosty® (Nalgene). Tras su almacenamiento temporal de 24-48 horas en un ultracongelador de -80°C dentro de este recipiente, las células se conservaron finalmente en nitrógeno líquido.

2.7. Siembra celular en placas multipocillo

Las células adherentes se lavaron con PBS y se añadió tripsina-EDTA, se incubaron durante 5 minutos y esta enzima se neutralizó con el medio de cultivo correspondiente. Las células se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en medio y una vez contado el número de células en la cámara de Neubauer, se sembraron en las placas de 96 o 384 pocillos a la densidad necesaria para la realización de los ensayos celulares.

3. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HUMANA RECOMBINANTE INTERLEUQUINA 17A

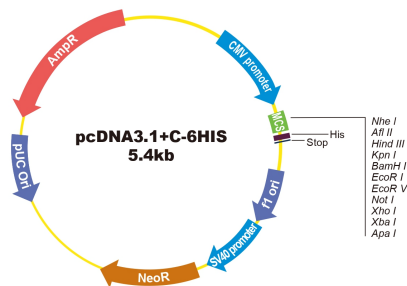
3.1. Clonaje de la secuencia de la interleuquina 17A en un plásmido de expresión en células eucariotas

La secuencia de la interleuquina 17A se obtuvo de GenScript en el vector pcDNA3.1+C-6His. La obtención de esta citoquina supone una herramienta de gran utilidad para activar el receptor IL-17RA/IL-17RC, dado que es su ligando endógeno. El vector de expresión contiene un promotor citomegalovirus (CMV) que posibilita la expresión del clon insertado en células de mamífero. También posee un gen de resistencia a la ampicilina y a la neomicina, que permiten seleccionar clones positivos en bacterias y células de mamífero, respectivamente. La presencia de seis histidinas en posición C-terminal de la secuencia de ADN circular permite purificar el clon mediante cromatografía de selección por afinidad utilizando columnas o resinas de níquel. Finalmente, es importante destacar que la secuencia de la interleuquina contiene un sitio correspondiente al péptido señal entre las posiciones 1 y 23

(MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKA), que promueve el transporte de la proteína a sistemas de membrana y facilita su liberación extracelular (22,23) (**figura 10**).

La secuencia de IL-17A se insertó en el sitio de clonaje múltiple entre las enzimas de restricción BamHI y XbaI. La secuencia traducida consta de 155 aminoácidos, cuyo peso molecular esperado es de 17,5 kDa.

A



B MTPGKTSLSVLLLLLSLEAIVKAGITIPRNPGPCNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSS
DYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPP
HCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHV

Figura 10. (A) Mapa con la secuencia, atributos distintivos y sitios de reconocimiento de enzimas de restricción correspondientes al plásmido pcDNA3.1+C-6His utilizado para el clonaje de la citoquina IL-17A. Contiene un promotor citomegalovirus (CMV) para la expresión de regiones codificantes en células de mamífero. (B) Secuencia de aminoácidos de IL-17A insertada en el plásmido pcDNA3.1+C-6His entre los sitios de restricción reconocidos por las enzimas BamHI y XbaI. El fragmento de la secuencia que se corresponde con el péptido señal está subrayado en amarillo.

3.2. Transformación de bacterias DH5 α con el plásmido pcDNA3.1+C-6His-IL-17A

Una vez obtenido el plásmido pcDNA3.1+C-6His-IL-17A se transformaron las bacterias competentes DH5 α para producir ADN recombinante. Para ello se descongeló un vial de bacterias (50 μ l) en hielo durante 10 minutos. Se añadieron 45 ng de pcDNA3.1+C-6His-IL-17A al vial, se mezclaron e incubaron durante 30 minutos en hielo. Se produjo un choque térmico de 42 °C durante exactamente 30 segundos y se dejó la mezcla en hielo durante 5 minutos. Se añadieron 950 μ l de medio de cultivo rico en nutrientes SOC y se incubaron a 37 °C durante 60 minutos a 250 rpm. Finalmente, se sembraron las bacterias transformadas en placas de LB con agar (6 g/l) y 100 μ g/ml de ampicilina, el antibiótico de selección. El crecimiento de colonias monoclonales se produjo tras haber sido incubadas a 37 °C durante la noche.

3.3. Cultivo en suspensión de bacterias para producir el ADN recombinante pcDNA3.1+C-6His-IL-17A

Para producir el ADN recombinante pcDNA3.1+C-6His-IL-17A necesario para la producción de la proteína humana recombinante IL-17A se aisló una de las colonias monoclonales de bacterias competentes DH5 α transformadas con el plásmido. Esta colonia se introdujo en 4 ml de medio de cultivo líquido: LB con 100 μ g/ml de ampicilina. Se incubó en agitación a 37 °C durante 8 horas para su crecimiento.

Transcurrido este tiempo, el minicultivo de bacterias transformadas con el vector pcDNA3.1+C-6His-IL-17A se diluyó en un matraz con 400 ml de medio LB líquido con 100 μ g/ml de ampicilina. Este cultivo se dejó crecer toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 37 °C en agitación para continuar

posteriormente con su purificación, tal y como se detalla en el apartado 3.4.

3.4. Purificación del plásmido pcDNA3.1+C-6His-IL-17A

Para la purificación del plásmido pcDNA3.1+C-6His-IL-17A se empleó el kit NucleoBond® Xtra Midi EF (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Una vez producido el crecimiento de las bacterias transformadas con pcDNA3.1+C-6His-IL-17A, se sedimentaron por centrifugación a 5000 g durante 15 minutos a 4 °C. Se añadieron 8 ml de tampón RES-EF para resuspender y se provocó la lisis de la pared bacteriana con 8 ml de LYS-EF, compuesto por hidróxido sódico y el detergente dodecil sulfato sódico (SDS). Se neutralizaron con 8 ml de NEU-EF y se mezclaron e incubaron 5 minutos en hielo. Este tampón contiene acetato de potasio, que produce la precipitación del SDS como KDS (dodecil sulfato potásico), lo que causa la precipitación de las proteínas, el ADN cromosómico y otros restos de las bacterias, mientras que el ADN plasmídico permanece disuelto. Al mismo tiempo se equilibró la columna con 15 ml de tampón EQU-EF, y posteriormente se añadió el contenido de la muestra. Se lavó con 5 ml de tampón FIL-EF, 35 ml de ENDO-EF y 15 ml de WASH-EF, de forma que se eliminaron las trazas de endotoxinas que pudieran quedar.

Se eluyó el ADN plasmídico retenido en la columna con 5 ml de tampón ELU-EF. La elución se lleva a cabo mediante un cambio a pH alcalino y una concentración de sales elevada. De esta manera, las cargas positivas de la resina de intercambio aniónico de la columna que mantienen retenido el ADN mediante sus grupos fosfato se neutralizan y el plásmido puede liberarse. El ADN eluido se precipitó con 3,5 ml de isopropanol y se centrifugó 1 hora a 5525 g y a 4 °C. El precipitado se lavó con 2 ml de etanol al 70 % y se volvió a centrifugar 5 minutos a 5525 g a temperatura ambiente. Se decantó

el líquido y se dejó secar el sedimento, que se reconstituyó a continuación con 250 µl de agua libre de endotoxinas. Finalmente, se determinó la concentración de ADN mediante un espectofotómetro de microvolúmenes NanoDrop™ 2000. El ADN purificado se conservó en alícuotas de 1000 µg/ml a -20 °C para la realización de transfecciones.

3.5. Transfección del plásmido pcDNA3.1+C-6His-IL-17A y expresión de la proteína IL-17A humana recombinante en células HEK 293

El plásmido pcDNA3.1+C-6His-IL-17A se transfectó en células HEK 293 de forma transitoria empleando el reactivo de transfección química PEI con el objetivo de producir IL-17A humana recombinante. Para ello, las células se sembraron en placas de cultivo de 150 mm (previamente tratadas con poli-D-lisina) con medio DMEM Glutamax™ complementado con un 10 % de suero fetal bovino y un 1 % de penicilina-estreptomicina. Se preparó una mezcla de transfección con 30 µg de ADN purificado y 120 µl de PEI (ratio ADN/PEI 1:4) en Opti-MEM®. La mezcla se incubó 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de complejos de ADN-lípidos catiónicos. Se añadió a las células lentamente, cuyo medio se cambió previamente a Freestyle™ 293 Expression Medium. Los cultivos celulares transfectados se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. Tras 48 horas se recogieron los sobrenadantes, que se centrifugaron a 3500 g, 10 minutos a 4 °C y se filtraron con una unidad de filtración con tamaño de poro de 0,22 µm. Se conservaron en un ultracongelador a -80°C.

3.6. Purificación de IL-17A humana recombinante

Las proteínas secretadas en los sobrenadantes procedentes de los cultivos celulares transfectados con el plásmido

pcDNA3.1+C-6His-IL-17A se concentraron con una unidad Amicon-15 3 kDa. La proteína IL-17A-His recombinante secretada al medio extracelular y, por lo tanto, enriquecida en esta fracción, se purificó mediante una columna HisTrap FF Crude de 5 ml en un sistema automatizado de cromatografía ÄKTA Start™. Para ello se empleó un método prediseñado de cromatografía por afinidad con un flujo de 3 ml/min, que incluye los pasos de equilibrado de la columna, inyección de la muestra de sobrenadantes, lavado de la fracción no unida y, finalmente, de elución fraccionada. La presencia de proteína en el fluido se monitorizó mediante un detector ultravioleta incorporado en el instrumento ÄKTA Start™.

Una vez obtenidas las fracciones de elución donde se encuentra IL-17A-His se realizó un proceso de desalinización, de forma que se eliminó el exceso de NaCl y de imidazol de la muestra. Para ello se empleó un dispositivo Pur-A-Lyzer™ Maxi Dialysis Kit MWCO 3.5 kDa o una columna HiTrap Desalting siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez preparados los extractos, se almacenaron en un ultracongelador a -80 °C.

3.7. Validación de la expresión de la proteína IL-17A-His mediante Western blot

Las fracciones purificadas de IL-17A-His se analizaron mediante inmunodetección por Western blot. Se cuantificó la proteína purificada en solución mediante el método de Lowry modificado con el ensayo de proteínas DC™ de Bio-Rad.

Se añadieron 6 µg de proteína total a un gel Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Plus. Previamente se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos en tampón de carga BOLT™ LDS 4X. Posteriormente, se llevó a cabo la separación de proteínas mediante electroforesis en tampón Bolt™ MES SDS a 165 V durante 30 minutos.

La membrana Immun-Blot® PVDF Membrane se activó en metanol durante un minuto. Tanto el gel de proteínas como la

membrana se sumergieron en tampón de transferencia Towbin modificado. La transferencia semi-seca de las proteínas del gel a la membrana de transferencia se produjo a 15 V constantes durante 90 minutos.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con TBS-T y se bloqueó con BSA al 5 % en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. La membrana se volvió a lavar con TBS-T y se incubó con el anticuerpo primario anti-IL17A de conejo (HPA052258) a 4 °C durante toda la noche a una dilución 1 : 4000. Una vez transcurrido este tiempo, membrana se volvió a lavar con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo ligado a HRP durante una hora a temperatura ambiente a una concentración de 1 : 5000.

A continuación, la membrana se lavó con TBS-T. Se añadió el reactivo quimioluminiscente de detección (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) y se incubó durante un minuto. Para su revelado se emplearon las películas fotográficas de Amersham Hyperfilm ECL y los reactivos revelador y fijador GBX de Carestream Kodak®.

4. IDENTIFICACIÓN DE LIGANDOS DE IL-17A/IL-17RA MEDIANTE CRIBADO VIRTUAL

Se realizó un cribado virtual de la quimioteca disponible en el grupo BioFarma para identificar potenciales ligandos de la interacción entre las proteínas IL-17A y el dominio A de su receptor IL-17R. Esta actividad se realizó con la colaboración del Dr. Christian Munteanu, profesor asociado de la Universidad de A Coruña, experto en quimioinformática.

La quimioteca Biofarma se compone de 60 000 compuestos con propiedades fisicoquímicas similares a fármacos, con diversidad

estructural y biológica, que permite identificar *hits* para un amplio espectro de dianas farmacológicas (181). Así, contiene distintos conjuntos de compuestos que permiten su aplicación a diversos proyectos de descubrimiento de fármacos: fármacos de reposicionamiento, con alrededor de 5 000 medicamentos que alcanzaron fases clínicas, incluidos fármacos aprobados por la FDA y la EMA; bibliotecas químicas focalizadas a diferentes dianas terapéuticas, como quinasas, GPCR o canales iónicos; compuestos académicos incluidos tras acuerdos con diferentes grupos de investigación de química médica; productos aislados de diferentes extractos naturales; compuestos de la quimioteca de productos con actividad antitumoral del National Cancer Institute; y compuestos seleccionados de proveedores comerciales que cubran la mayor cantidad de espacio químico posible.

De esta manera, el análisis *in silico* de la quimioteca Biofarma permite seleccionar los compuestos en función de su afinidad prevista para las dianas más representadas en la farmacopea, aumentando así las posibilidades de encontrar resultados positivos. Las predicciones obtenidas se resumen en la **figura 10**.

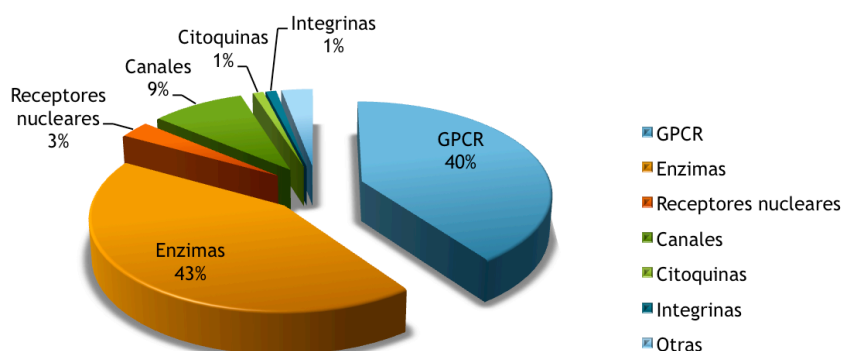


Figura 10. Predicción de la actividad farmacológica de los compuestos de la quimioteca BioFarma sobre las dianas más representadas en la farmacopea. Imagen realizada por la autora.

Para generar una quimioteca focalizada a la interacción entre IL-17A e IL-17RA mediante un cribado virtual se generó un archivo SDF con la lista de moléculas correspondiente a la quimioteca BioFarma. Se generó un archivo *phyton* único en el que se convirtieron dichas moléculas de formato 2D a 3D mediante el *software* Babel. Se optimizaron manualmente y se transformaron a formato PDB 3D (Protein Data Bank). Posteriormente, las moléculas PDB se convirtieron a formato Vina PDBQT para poder ser utilizadas en el programa de simulación de unión a proteínas Autodock Vina (182) (**figura 12**).

Por otro lado, se seleccionaron la estructuras de las proteínas diana correspondientes en PDB y se descargaron en formato PDB 3D, generando un archivo *phyton*. Se dividieron las múltiples conformaciones moleculares y se extrajo solo la parte proteica. Con el objetivo de utilizar el *software* Autodock Vina, las proteínas en PDB se convirtieron a un formato Vina PDBQT (**figura 12**).

Las estructuras de las proteínas diana obtenidas de PDB para realizar el análisis por *docking* y cribado virtual fueron las siguientes: 2VXS, 4HR9, 4HSA, 4QHU, 5HHV, 5HHX, 5HI3, 5HI4 y 5HI5; todas ellas disponibles en el momento de realización del estudio. Representan la interleuquina 17A libre y unida a diversos ligandos, así como la formación del complejo de esta proteína unida a la subunidad IL-17RA del receptor.

Una vez obtenidas las moléculas de la quimioteca y las estructuras proteicas en el mismo formato Vina PDBQT, se creó una carpeta para cada par ligando-proteína diana, de archivos *phyton*. Se crearon carpetas de configuración Vina y se generaron archivos nuevos a partir de los ya obtenidos, que se separaron en grupos y se enviaron a BioCAI HPC, una cola de trabajo de computación en paralelo. De esta cola se extrajeron como resultados la energía de afinidad (AE) (kcal/mol) y un modelo gráfico de interacción correspondiente a cada par ligando-proteína diana (**figura 12**).

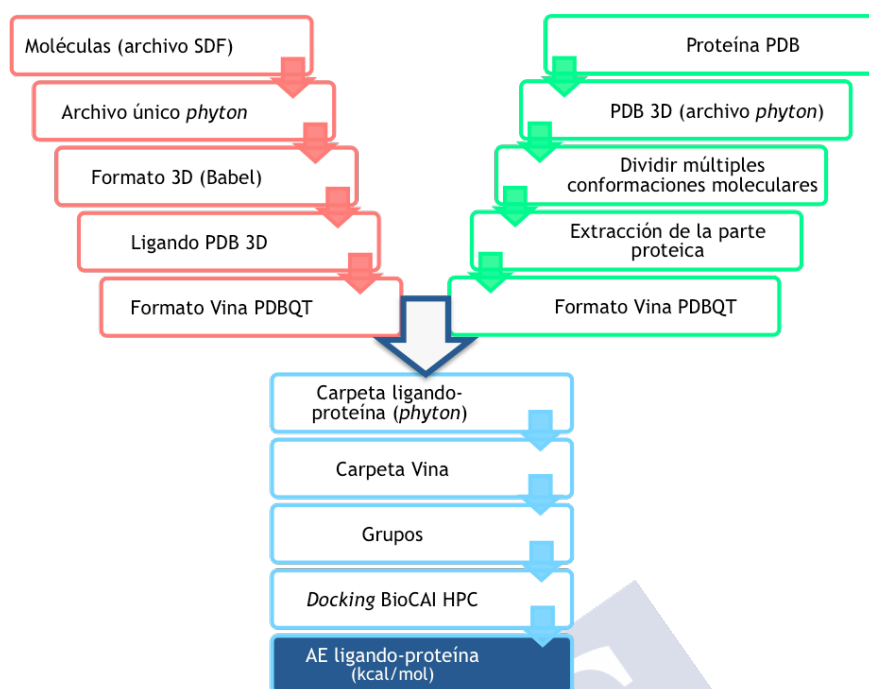


Figura 12. Esquema de la metodología para la realización de un *docking* con Autodock Vina. Esquema realizado por la autora.

5. ENSAYO *LABEL-FREE* DE REDISTRIBUCIÓN DINÁMICA DE MASAS (DMR)

5.1. Fundamento de la tecnología de redistribución dinámica de masas

La tecnología *label-free* de redistribución dinámica de masas (DMR) permite estudiar la unión entre proteínas o proteínas y moléculas sin necesidad de marcaje. Para ello se emplea un biosensor desarrollado por Corning® (tecnología Epic®) en formato de placa multipocillo y se realiza la lectura de la medida de DMR en el equipo EnSpire® Multimode Plate Reader.

Cada uno de los 384 pocillos de las placas EnSpire-LFB® tiene un biosensor óptico integrado en el fondo. En dicho biosensor existe una red de refracción que sirve de guía de ondas resonantes entre las capas superior e inferior del mismo.

Cuando la fuente de luz de longitud de onda amplia que se encuentra en el EnSpire® Multimode Plate Reader irradia la parte inferior de la placa, parte de esta luz se difracta con un ángulo dependiente de la longitud de onda (183). Para una longitud de onda muy estrecha, la luz se difracta en un ángulo muy amplio, de forma que estará en resonancia con la red de refracción, la cual actúa como guía de ondas resonantes (**figura 13**).

La intensidad de la luz dentro de la red de refracción se distribuye perpendicularmente al fondo de la placa, y tiene una intensidad mayor en el centro de la red. Una pequeña parte de esta luz sale de dicha red hacia la parte inferior del pocillo. Así se forma la zona de interacción, que tiene unos 150 nm de altura desde el fondo del pocillo. Las condiciones de resonancia de este sistema óptico están condicionadas por cambios en el índice de refracción de la zona de interacción, de forma que la longitud de onda reflejada por el biosensor será sensible a alteraciones en la zona de interacción (183)

(figura 13). Los cambios en el índice de refracción de la zona de interacción del pocillo de la placa EnSpire-LFB® pueden deberse a la presencia o ausencia de proteínas o moléculas, a cambios conformacionales de la proteína, a tampones con distinto índice de refracción o a cambios en la temperatura.

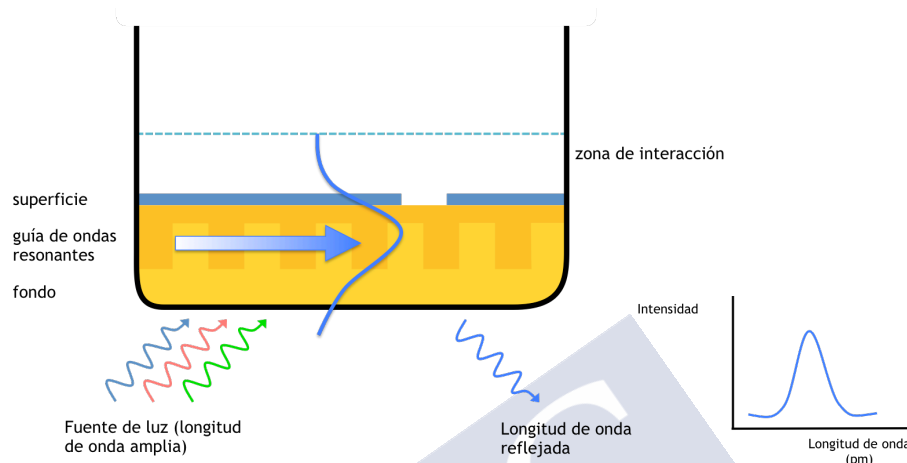


Figura 13. Biosensor óptico y fondo del pocillo de una placa EnSpire-LFB®. Cuando la fuente de luz longitud de onda amplia irradia el fondo de la placa, una parte de esta, de longitud de onda muy estrecha, se difracta en un ángulo muy amplio, en resonancia con la red de refracción. La longitud de onda reflejada y detectada por el sensor varía en función de los cambios en el índice de refracción en la zona de interacción. Imagen realizada a partir de Du *et al.*, 2012 con el permiso de Cambridge University Press®.

Los cambios que se producen en la zona de interacción de los pocillos de la placa EnSpire-LFB® se registran siguiendo un perfil cinético, de modo que se determina la influencia de cada uno de los componentes que hay en cada pocillo mediante variaciones en la longitud de onda reflejada. Debido a este perfil cinético, existen dos medidas de DMR: la lectura basal y la final. En la primera se establece el estado basal de cada pocillo (que solamente contiene la proteína diana inmovilizada), mientras que en la segunda se

determina la DMR una vez añadidos los ligandos, que generan una modificación en la proteína diana (**figura 14**).

El biosensor óptico de las placas de 384 pocillos EnSpire-LFB® tiene dos sectores. Uno de ellos corresponde a un área de referencia donde las proteínas no pueden inmovilizarse, de modo que se utiliza como control para corregir efectos indeseados y de confusión debidos a moléculas libres o a cambios en la temperatura (185). Esto permite que la medida final de DMR únicamente se corresponda con la unión de un ligando a la proteína diana inmovilizada (**figura 14**).

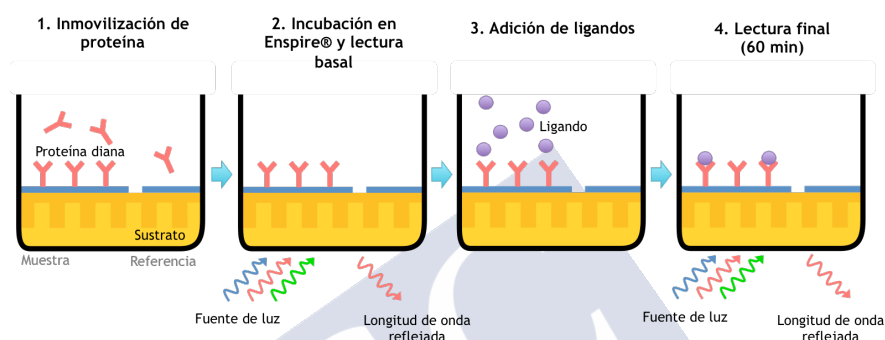


Figura 14. La proteína diana se inmoviliza sobre la superficie de acoplamiento amino de la placa, generalmente durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se incuba dentro del EnSpire® Multimode Plate Reader y se realiza una lectura basal. Se adicionan los ligandos correspondientes y, si se unen, se incorporan a la masa localizada en la zona de interacción próxima al biosensor. Esto produce un cambio en la longitud de onda reflejada, que se detecta y cuantifica con el equipo EnSpire® Multimode Plate Reader. Imagen realizada a partir de Du *et al.*, 2012 con el permiso de Cambridge University Press®.

El biosensor de las placas EnSpire-LFB® tiene un recubrimiento de un polímero de anhídrido maleico que, en un ambiente hidrofílico (generado con la activación de la placa), presenta numerosos grupos de ácido carboxílico. Estos grupos carboxílicos permiten la inmovilización de la proteína diana mediante acoplamiento de sus grupos amino (185). Para una buena inmovilización dicha proteína diana es necesario seleccionar el pH más adecuado de forma que sus

grupos amino se encuentren cargados positivamente. Sin embargo, es necesario evaluar que el pH seleccionado no impida su función biológica ni, por lo tanto, la unión de los ligandos a dicha proteína.

5.2. Desarrollo de un ensayo de unión a IL-17RA ECD basado en la tecnología de redistribución dinámica de masas

Las placas de alta sensibilidad EnSpire-LFB® se activaron con EDC 400 mM y sulfo-NHS 100 mM diluidos en agua ultrapurificada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con agua ultrapurificada 4 veces, empleando los sistemas automatizados Multidrop™ Combi y el aspirador BioTek® 405 TS washer. Una vez terminados los lavados, se vació el contenido líquido de la placa para proceder a la inmovilización del receptor.

La proteína utilizada para en este ensayo es IL-17RA ECD Fc, es decir, el dominio extracelular de la subunidad A del receptor de IL-17 fusionada a un dominio Fc, en forma homodimérica. El dominio Fc (fragmento cristizable) es el de una inmunoglobulina que permite, entre otras aplicaciones, la purificación de la proteína de fusión. En este caso, también podría facilitar la orientación de la proteína en ensayos de inmovilización, de forma que el dominio extracelular de IL-17RA quede lo más accesible posible para su unión con ligandos (186,187).

Se probaron distintas concentraciones de IL-17RA ECD Fc para comprobar los valores de inmovilización a 5, 25, 50, y 75 µg/ml. Asimismo, se emplearon distintos tampones para valores pH diferentes de forma que se seleccionase el ideal para el proceso de inmovilización: citrato de sodio 20 mM a pH 4; acetato de sodio 20 mM a pH 5; acetato de sodio 20 mM a pH 5,5; citrato de sodio 20 mM a pH 6; y fosfato de sodio 20 mM a pH 7.

Tras añadir la proteína e incubar la placa toda la noche a 4 °C, esta se lavó con tampón de ensayo (PBS con 0,005 % de Tween 20, pH 7,4) con ayuda de los sistemas automatizados mencionados con anterioridad. La línea basal del ensayo de redistribución dinámica de masas se leyó tras 3 horas de incubación de la placa dentro del EnSpire® Multilabel Plate Reader a temperatura ambiente, de forma que se estabilizaron los sensores de la placa EnSpire®-LFB y el detector *label-free* DMR del equipo.

Una vez obtenida la línea basal se añadieron concentraciones crecientes de preparado de IL-17A en un rango de concentración de proteína entre 0,078 µM y 2,5 µM en tampón de ensayo. Por último, se realizó la lectura cinética final de la señal de DMR de 30 repeticiones (1 cada 2 minutos).

5.3. Determinación de la unión de ligandos identificados por cribado virtual al receptor IL-17RA mediante redistribución dinámica de masas

Se evaluó la posible unión al dominio extracelular de IL-17RA de los 67 compuestos de la quimioteca BioFarma seleccionados previamente mediante cribado virtual.

Las placas de alta sensibilidad EnSpire-LFB® se activaron con EDC 400 mM y sulfo-NHS 100 mM diluidos en agua ultrapurificada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con agua ultrapurificada 4 veces, empleando los sistemas automatizados Multidrop™ Combi y el aspirador BioTek® 405 TS washer. Una vez terminados los lavados, se vació el contenido líquido de la placa para proceder a la inmovilización de IL-17RA ECD Fc.

Tras añadir IL-17RA ECD Fc en tampón de inmovilización (acetato de sodio 20 mM a pH 5,5) e incubar la placa toda la noche a 4 °C, esta se lavó con tampón de ensayo (PBS con 0,005 % de Tween 20, pH 7,4) con ayuda de los sistemas automatizados mencionados

con anterioridad. La línea basal del ensayo de redistribución dinámica de masas se leyó tras 3 horas de incubación de la placa dentro del EnSpire® Multilabel Plate Reader a temperatura ambiente.

Una vez obtenida la línea basal se añadieron los 67 compuestos seleccionados a una concentración de 20 μM en tampón de ensayo. Como control positivo, se añadió el preparado de IL-17A a una concentración de 1,7 μM y como control negativo se empleó tampón de ensayo. Por último, se realizó la lectura cinética final de la señal de DMR durante 30 repeticiones (1 cada 2 minutos) en el EnSpire® Multilabel Plate Reader.

Los *hits* identificados se caracterizaron mediante curvas concentración-respuesta con concentraciones en un rango entre 0,4 μM y 100 μM por triplicado según el protocolo descrito. Las diluciones de cada uno de los compuestos se realizaron en tampón de ensayo.

5.4. Análisis estadístico y procesamiento de datos de unión obtenidos mediante DMR

Los resultados obtenidos de las medidas de DMR se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). Las unidades de respuesta son los picómetros (pm) dado que se determina una distancia, concretamente, un cambio en el ángulo del índice de refracción. El análisis estadístico y procesamiento de datos se realizó en el programa informático GraphPad Prism® versión 6.0.

La lectura basal de DMR consiste en 5 repeticiones de la línea basal, y se utiliza como referencia para la medida final de DMR. La variación en la longitud de onda a cada tiempo se denomina “respuesta” (R), y se obtiene restando la lectura basal (S^{basal} a un tiempo de referencia t_b) a la final (S). Dicha diferencia se mide en picómetros (pm) utilizando la fórmula mostrada a continuación:

$$R(t) = S(t) - S^{basal}(t_b)$$

Debido a que el biosensor de la placa EnSpire-LFB® tiene dos sectores, para cada tiempo, la señal se obtiene a partir de la diferencia entre el valor de la señal del área que permite la inmovilización ($S_{señal}$) menos la señal correspondiente al área de referencia ($S_{referencia}$).

$$S(t) = S_{señal}(t) - S_{referencia}(t)$$

Por lo tanto, el valor de respuesta (R) final para un tiempo (t) se obtiene de la siguiente manera:

$$R(t) = S(t) - S^{basal}(t_b) = [S_{señal}(t) - S_{referencia}(t)] - [S^{señal\ basal}(t_b) - S^{referencia\ basal}(t_b)]$$

Para determinar el grado de inmovilización de la proteína diana en las placas EnSpire-LFB® se cuantificó la diferencia entre la media de la señal de proteína inmovilizada durante la línea basal menos la media de la señal del tampón de inmovilización:

$$inmovilización\ (pm) = \frac{media\ proteína\ (fm) - media\ tampón\ (fm)}{1000}$$

Para determinar la calidad del ensayo de DMR en la identificación de *hits* se utilizaron los parámetros de señal específica/señal de fondo y el coeficiente de variación, así como el cálculo del valor de Z', ampliamente aplicados en el desarrollo de ensayos de cribado de alto rendimiento (188).

La relación entre la señal específica y la señal de fondo considera la separación entre ambas señales, aunque no su variabilidad (188,189). Por otro lado, el coeficiente de variación (CV) sí informa sobre la variabilidad del ensayo, que debe ser menor o igual al 20 % para el control positivo y el negativo (189).

$$\text{señal específica/señal de fondo} = \frac{\text{promedio de la señal máxima}}{\text{promedio de la señal mínima}}$$

El promedio de la señal máxima se corresponde con la media de los valores de respuesta del ligando endógeno IL-17A como control positivo, y el promedio de la señal mínima a los valores de tampón de ensayo (control negativo).

El factor Z' es el parámetro más indicativo de la calidad de un ensayo de cribado dado que proporciona información sobre la distribución de los datos y su magnitud. Z' puede tener valores entre $-\infty$ y 1. Un ensayo excelente, que separe bien las distribuciones de los controles positivo y negativo, tendría un valor de Z' entre 0,5 y 1; y uno con una separación moderada, que considera aceptable, se encontraría con un Z' entre 0 y 0,5 (189,190).

$$Z' = 1 - \frac{(3 \cdot \sigma_{\text{positivo}}) + (3 \cdot \sigma_{\text{negativo}})}{\mu_{\text{positivo}} - \mu_{\text{negativo}}}$$

Donde σ_{negativo} y μ_{negativo} , y σ_{positivo} y μ_{positivo} son los valores de desviación estándar de la respuesta y valor medio de la respuesta de los pocillos con tampón de ensayo y con IL-17A, respectivamente.

Una vez analizada la calidad del ensayo y los datos correspondientes, el siguiente paso es establecer un criterio que permita decidir qué compuestos deberían ser *hits*. Una forma de establecer el umbral para ello puede ser la utilización de un número de desviaciones estándar (que habitualmente son tres) sumadas a la

media de los valores de todos los compuestos ensayados (191). En este trabajo se consideraron *hits* aquellos cuya respuesta superó el valor de la media más dos desviaciones estándar de la respuesta del conjunto de los compuestos ensayados.

Para determinar la K_D , es decir, la constante de disociación en el equilibrio, se utilizó el valor de respuesta resultado de la diferencia entre el valor máximo de señal y la línea basal. La K_D proporciona el valor de concentración de compuesto para la cual la mitad de los sitios de unión están ocupados en el equilibrio. Se calcula a partir de la siguiente ecuación (modelo de regresión lineal) que describe el equilibrio de unión de un compuesto a la proteína en función del incremento de concentración de dicho compuesto:

$$R = \frac{B_{max} \cdot X}{K_D + X}$$

Donde R es la respuesta y X es la concentración de compuesto. B_{max} es el máximo número de sitios de unión.

6. ENSAYO BIOFÍSICO DE RESONANCIA DE PLASMONES SUPERFICIALES (SPR)

6.1. Fundamento de la tecnología de resonancia de plasmones superficiales

La resonancia de plasmones superficiales (SPR) es una tecnología que proporciona datos de unión, afinidad, cinética y especificidad entre biomoléculas sin necesidad de marcaje (se trata, por tanto, de una técnica *label-free*, como la redistribución dinámica de masas).

En los sistemas Biacore™ las interacciones de proteínas y/o moléculas se producen en un chip sensor extraíble y se monitorizan mediante un detector de SPR. La adición de muestras al chip sensor se realiza mediante un sistema de microfluídica que emplea volúmenes muy pequeños, del orden de pocos microlitros. Dicho sistema también permite añadir los tampones desde sus botellas correspondientes así como vaciar los líquidos residuales tras el procedimiento experimental.

El sensor de los chips de SPR está formado por un portaobjetos de vidrio cubierto por una fina lámina de oro. El recubrimiento del chip de oro más frecuente consiste en una matriz de dextrano que sirve como sustrato para inmovilizar moléculas, puesto que proporciona un ambiente hidrofílico que favorece esta interacción. La molécula inmovilizada en la superficie del chip sensor se denomina ligando, y la inyectada en solución a un flujo continuo es el analito (192–194).

La resonancia de plasmones superficiales es un fenómeno que ocurre cuando una fuente de luz polarizada incide sobre una fina capa conductora de metal (oro) en la interfaz entre dos medios con distinto índice de refracción (192,193). El metal refleja la luz, de modo que cambiando los ángulos de incidencia se observa que, para un determinado ángulo, la intensidad de luz reflejada alcanza un mínimo. Los electrones libres de la lámina de oro absorben la energía de los fotones, de forma que reducen la intensidad de luz reflejada y dan lugar a un campo de ondas evanescentes. El ángulo al que se produce la mayor pérdida de intensidad de luz reflejada se denomina ángulo de resonancia o descenso de SPR (192,193) (**figura 15**).

La profundidad de penetración del campo evanescente no excede unos cientos de nanómetros (200–300 nm) y desciende exponencialmente con la distancia desde la superficie. El índice de refracción en las inmediaciones de la superficie de la lámina de oro varía cuando la masa adsorbida sobre este cambia. Las condiciones del campo de ondas evanescentes son muy sensibles a los cambios en dicho índice de refracción y, en consecuencia, lo son las condiciones

de SPR. Este cambio en el ángulo es proporcional a la masa de material unido y puede ser registrado a tiempo real, de modo que se proporciona información de la cinética de interacción (192,193) (**figura 15**).

El resultado de la detección de los cambios en el índice de refracción y, por lo tanto, de la SPR, se muestra en un sensorgrama, que consiste en una representación de la respuesta frente al tiempo (192). Proporciona información sobre la tasa de interacción (asociación, disociación) y las constantes cinéticas, así como datos de las constantes de afinidad (193).

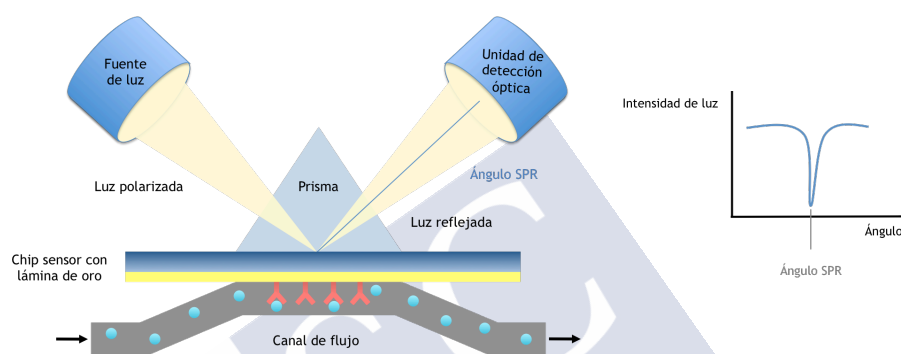


Figura 15. Fundamento de la tecnología SPR. La proteína diana (ligando) se inmoviliza del chip sensor. Cuando las moléculas (analitos) se unen a esta, el índice de refracción próximo a la superficie cambia, alterando el ángulo de SPR, que marca un mínimo en la intensidad de luz reflejada. El cambio en el ángulo de SPR es proporcional a la masa de material unido. Imagen realizada a partir de Du *et al.*, 2012 con el permiso de Cambridge University Press®.

6.2. Evaluación de la interacción de los ligandos con IL-17RA mediante resonancia de plasmones superficiales

El ensayo de resonancia de plasmones superficiales se llevó a cabo en un equipo Biacore S200 SPR. Esta tarea se desarrolló en colaboración del Dr. Kilian Huber, experto en química biológica del Departamento de Medicina Nuffield de la Universidad de Oxford.

La proteína (ligando) IL-17RA ECD Fc (25 µg/ml) se capturó en un chip sensor Series S CM5 mediante acoplamiento de grupos amino hasta alcanza un nivel de 10 000 unidades de respuesta (*response units*, RU) de proteína inmovilizada. El tampón de inmovilización utilizado fue acetato de sodio 10 mM a pH 5. Para la activación de los grupos químicos del chip Series S CM5 se utilizaron EDC 400 mM y sulfo-NHS 100 mM, previamente a la adición de la proteína. La superficie se desactivó utilizando hidrocloreuro de etanolamina a 1 M. Uno de los canales del chip sensor se utilizó sin proteína inmovilizada, como referencia para el análisis de datos.

El tampón de migración utilizado fue HEPES 20 mM, NaCl 200 mM y Tween-20 al 0,05 %, pH 7,4 con un 3 % de DMSO. Los compuestos *hit* (analitos) se inyectaron a un flujo de 10 µl/min durante 60 segundos de unión, y el experimento se realizó a 15 °C. Se empleó un rango de concentraciones de cada compuesto de 0,078 µM a 50 µM.

Como control de unión inespecífica o no-unión se utilizaron los compuestos *hit* en el mismo rango de concentraciones sobre la unión a la proteína NUDT21 en las mismas condiciones que IL-17RA ECD Fc. Dichos ensayos de unión estaban validados para analitos conocidos a los que previamente se les había realizado una detallada caracterización.

6.3. Análisis y procesamiento de datos de SPR

El análisis de datos se realizó mediante el software de GE Healthcare para calcular las constantes de unión. Se utilizó la corrección por solvente, que permite ajustar la respuesta de los compuestos evitando la interferencia de DMSO.

Para establecer el nivel de inmovilización del ligando (proteína) que es necesario para obtener una respuesta determinada de analito se utilizó la siguiente ecuación, que tiene en cuenta los tamaños de ligando y analito (por lo tanto, su masa molecular, MM). El

parámetro de capacidad de unión del analito (R_{max} , máxima respuesta) determina la respuesta esperada de los compuestos. Asumiendo una estequiometría de unión 1:1, la ecuación es la siguiente:

$$R_{max} (RU) = \frac{MM \text{ analito}}{MM \text{ ligando}} \times \text{nivel inmovilización ligando (RU)}$$

Para la determinación de la afinidad de los compuestos por la proteína, se representó la respuesta en el equilibrio (R_{eq}) frente a la concentración de analito (C). La K_D es la constante de disociación en el equilibrio, y la inversa de la de asociación, K_A ($K_D=1/K_A$).

$$R_{eq} = \frac{K_A \cdot C \cdot R_{max}}{K_A \cdot C + 1}$$

7. DETERMINACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE CITOQUINAS MEDIANTE INMUNOENSAYOS LUMINEX®

7.1. La tecnología Luminex® para la determinación de citoquinas con inmunoensayos multiplexados

La tecnología Luminex® utiliza microesferas (magnéticas o no) que se caracterizan por tener el mismo radio (5,6 μm) pero distinta coloración fluorescente interna, la cual se limita a un espectro único entre rojos e infrarrojos. Dichas microesferas están recubiertas por anticuerpos de captura que unen el analito de interés. Con la adición de un anticuerpo de detección biotinilado se forma un sándwich antígeno-anticuerpo. A continuación, se añade estreptavidina conjugada con ficoeritrina (PE), la cual se une al anticuerpo de detección biotinilado, que permite la lectura en el equipo. En el caso del equipo MAGPIX®, las microesferas son magnéticas y emplea dos

LEDs: uno identifica el analito (el canal de fluorescencia de la coloración roja) y el segundo determina la magnitud de la señal de PE (recogida como la mediana de la intensidad de fluorescencia), que reflejará la cantidad de analito existente en las muestras (195,196) (**figura 16**).

Dicha tecnología permite realizar múltiples determinaciones de citoquinas en una única reacción dado que cada colección de microsferas tiene un espectro único. Además, la sensibilidad de detección es muy alta debido a que cada una de las microsferas está recubierta con hasta 100 000 anticuerpos de captura (195–197).

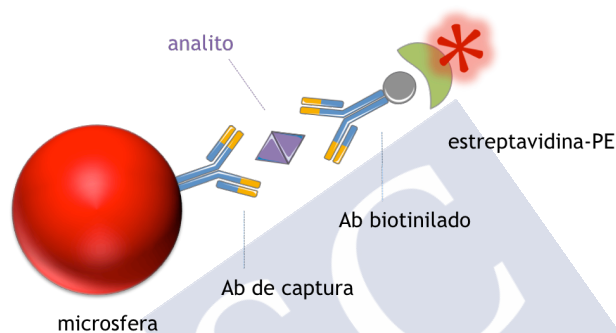


Figura 16. Fundamento de los inmunoensayos de la tecnología Luminex®. Las microesferas magnéticas están recubiertas de anticuerpos de captura que se unen al analito de interés. Se añade un anticuerpo de detección biotinilado, que forma un sándwich con el primero y con estreptavidina conjugada a ficoeritrina (PE). Un imán en el analizador MAGPIX® captura las bolas magnéticas y dos LEDs las iluminan: uno identifica el analito y el otro determina la magnitud de la señal de PE, que se corresponderá con la cantidad de analito existente en la muestra. Imagen realizada por la autora.

7.2. Desarrollo de un ensayo de liberación de quimioquinas inflamatorias en células tumorales de colon

La línea celular HT-29 (células humanas epiteliales de adenocarcinoma colorrectal) se ha empleado en la caracterización de

la actividad inhibitoria de anticuerpos monoclonales diseñados para neutralizar específicamente la IL-17A. Así, estos anticuerpos disminuyen la secreción de CXCL1 (también denominada GRO α) en las células HT-29 estimuladas con IL-17A (198,199). Esto es posible debido a que las subunidades A y C del receptor de IL-17A se expresan ampliamente en tejido intestinal (200).

La interlequina-17A actúa, asimismo, de forma sinérgica con el factor inflamatorio TNF α para aumentar la expresión de quimioquinas y citoquinas como CXCL1, IL-8, CCL20, CXCL5 e IL-6 (178,201,202). Así, esta línea celular es un modelo experimental adecuado para cuantificar los cambios en la liberación de quimioquinas mediada por IL-17.

Se sembraron 50 000 células por pocillo de la línea celular HT-29 en medio McCoy's 5A complementado con un 10 % de FBS y un 1 % de penicilina-estreptomicina en una placa de 96 pocillos transparente estéril tratada para cultivo celular. Se incubaron 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, se trataron con 50 ng/ml de IL-17A humana recombinante en ausencia o presencia de un rango de concentraciones del péptido anti-IL-17A IHVTIPADLWDWINK (172) de entre 15,6 nM y 1000 nM, diluido en el medio de cultivo indicado. Dicho péptido, con un peso molecular de 1863,3 g/mol se empleó como control de inhibición de la función inflamatoria de IL-17A al unirse de forma potente y selectiva a su receptor en las células HT-29. Tras 24 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -80 °C.

Los sobrenadantes de las células HT-29 tratadas con IL-17A con o sin péptido anti-IL-17A se utilizaron para determinar CXCL1 mediante el kit Human ProcartaPlex® Simplex kit. En primer lugar, se definió el diseño de placa para consecutivamente añadir las microsferas magnéticas (disueltas en el tampón de lavado proporcionado en el kit). Se lavaron con ayuda del aspirador BioTek® 405 TS washer y un imán, que impidió que las microsferas fueran aspiradas al retirar el volumen de lavado. A continuación, se añadieron las muestras y el estándar correspondiente a CXCL1. Se

selló la placa con una película adhesiva y se tapó con una tapa opaca y se incubó toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se agitó la placa durante 30 minutos a 500 rpm a temperatura ambiente, y se lavó siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Se añadió el anticuerpo de detección correspondiente (en el disolvente de anticuerpo de detección), y se incubó 30 minutos en agitación a 500 rpm. Una vez transcurrida la incubación, se volvió a lavar y se añadió estreptavidina conjugada con ficoeritrina (SAPE), que se incubó 30 minutos a 500 rpm. Posteriormente, se lavó y se añadió el tampón de lectura, que se incubó durante 5 minutos a 500 rpm. Finalmente, se procedió a la lectura (previa definición del protocolo para cuantificar CXCL1) en el instrumento Luminex® MAGPIX®.

7.3. Evaluación de la actividad inhibitoria de los ligandos de IL-17A/IL-17RA en un ensayo de liberación de CXCL1 en la línea celular HT-29

Se sembraron 50 000 células por pocillo de la línea celular HT-29 en medio McCoy's 5A complementado con un 10 % de FBS y un 1 % de penicilina-estreptomicina en una placa de 96 pocillos transparente estéril tratada para cultivo celular. Se incubaron 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, se trataron con 50 ng/ml de IL-17A humana recombinante en presencia de un rango de concentraciones ligandos entre 1,56 µM y 100 µM, diluidos en el medio de cultivo indicado. Tras 24 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -80 °C.

Los sobrenadantes de las células HT-29 tratadas con IL-17A y los compuestos *hit* se utilizaron para la determinación de CXCL1 mediante el kit Human ProcartaPlex® Simplex kit, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.2.

7.4. Desarrollo de un ensayo de liberación de quimioquinas inflamatorias en queratinocitos humanos

Las células HaCaT se utilizan ampliamente como modelo de queratinocitos humanos, dado que se trata de una línea celular espontánea y no tumoral, con morfogénesis normal y que expresa la mayoría de marcadores de superficie (203–205).

Los queratinocitos humanos son la población celular de la piel que más expresa el receptor de IL-17. IL-17 induce la producción de citoquinas proinflamatorias en las células HaCaT, como IL-8, CXCL1 y CXCL5 (206,207). La activación sinérgica de IL-17A junto con TNF α en queratinocitos humanos incrementa la secreción de quimioquinas como IL-8 y CCL20 (208–210). Se trata, en consecuencia, de un modelo experimental adecuado para caracterizar la actividad de los ligandos de IL-17A/IL-17RA en un contexto biológico muy cercano al perfil clínico de desarrollo de agentes biológicos anti-IL-17 autorizados para el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes como la psoriasis.

Se sembraron 12 500 células por pocillo de la línea celular HaCaT en medio DMEM GlutaMAX[®] complementado con un 10 % de FBS y un 1 % de penicilina-estreptomicina en una placa de 96 pocillos transparente estéril tratada para cultivo celular. Se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, se trataron con 100 ng/ml de IL-17A recombinante humana y 10 ng/ml de TNF α en ausencia o presencia de un rango de concentraciones del péptido anti-IL-17A (172) entre 15,6 nM y 1000 nM, diluidos en el medio de cultivo indicado. Tras 24 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -80 °C.

Los sobrenadantes de las células HaCaT tratadas con IL-17A y TNF α con o sin péptido anti-IL-17A se utilizaron para determinar la presencia de CCL20 e IL-8 mediante el kit Human ProcartaPlex[®] Simplex kit. En primer lugar, se definió el diseño de placa para consecutivamente añadir las microsferas magnéticas (disueltas en el tampón de lavado proporcionado en el kit). Se lavaron con ayuda del

aspirador BioTek® 405 TS washer y un imán, que impidió que las microsferas fueran aspiradas al retirar el volumen de lavado. A continuación, se añadieron las muestras y los estándares correspondientes a CCL20 e IL-8. Se selló la placa y se incubó toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, la placa se agitó durante 30 minutos a 500 rpm a temperatura ambiente, y se lavó siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Se añadieron los anticuerpos de detección correspondientes (en el disolvente de anticuerpo de detección), y se incubaron 30 minutos en agitación a 500 rpm. Una vez transcurrida la incubación, se volvió a lavar y se añadió estreptavidina conjugada con ficoeritrina (SAPE), que se incubó 30 minutos a 500 rpm. Posteriormente, se lavó y se añadió el tampón de lectura, que se incubó durante 5 minutos a 500 rpm. Finalmente, se procedió a la lectura (previa definición del protocolo para cuantificar CCL20 e IL-8) en el instrumento Luminex® MAGPIX®.

7.5. Evaluación de la actividad inhibitoria de los ligandos en un ensayo de liberación de IL-8 y CCL20 en la línea celular HaCaT

Se sembraron 12 500 células por pocillo de la línea celular HaCaT en medio DMEM GlutaMAX® complementado con un 10 % de FBS y un 1 % de penicilina-estreptomicina en una placa de 96 pocillos transparente estéril tratada para cultivo celular. Se incubaron 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, se trataron con 100 ng/ml de IL-17A recombinante humana y/o 10 ng/ml de TNF α en presencia de un rango de concentraciones de los ligandos de IL-17A/IL-17RA entre 1,56 μ M y 100 μ M, diluidos en el medio de cultivo indicado. Tras 24 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -80 °C.

Los sobrenadantes de las células HaCaT tratadas con IL-17A y/o TNF α con los ligandos se utilizaron para la determinación de CCL20 e

IL-8 mediante el kit Human ProcartaPlex® Simplex kit, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.4.

7.6. Análisis y procesamiento de datos de liberación de quimioquinas mediante Luminex®

Los resultados de la cuantificación de citoquinas mediante la tecnología Luminex® se proporcionan como la mediana de la intensidad de fluorescencia (*Median Fluorescence Intensity*, MFI). Los resultados de MFI se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). La concentración de las muestras de Luminex se calcula a partir de la representación de los datos de concentración de los estándares correspondientes frente a la MFI generada para cada uno de ellos.

La potencia de inhibición de los ligandos y el péptido anti-IL-17A se determinó mediante el cálculo de la IC_{50} , es decir, la concentración de molécula necesaria para reducir la respuesta agonista al 50 % de la respuesta máxima. La IC_{50} se determinó a partir de curvas concentración-respuesta (sigmoideas) ajustadas a un modelo de regresión lineal, según la siguiente ecuación:

$$Y = R_{\min} + \frac{(R_{\max} - R_{\min})}{1 + 10^{\log(IC_{50}-X) \cdot \text{pendiente}}}$$

Donde R_{\max} y R_{\min} definen las respuestas máxima y mínima de cada curva, respectivamente. El análisis se realizó en el programa informático *GraphPad Prism*® versión 6.0.

La comparación estadística entre grupos se realizó en conjuntos de datos que se ajustaron a una distribución normal, resultado de al menos tres experimentos independientes. Se empleó un análisis de varianza (ANOVA). La significación estadística se estableció en $\alpha = 0,05$.

8. LOS QUERATINOCITOS HACAT COMO MODELO *IN VITRO* DE PIEL

Con el objetivo de analizar la morfología de los queratinocitos de la línea celular HaCaT se sembraron 5 000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos CellCarrier-96 Ultra negra con el fondo transparente. El medio utilizado fue DMEM GlutaMAX® complementado con un 10 % de FBS y un 1 % de penicilina-estreptomicina. Se incubaron 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Al día siguiente se cambió su medio de cultivo (control sin tratar) o se trataron con 250 ng/ml de IL-17A recombinante humana durante 24 horas.

Una vez transcurrido el día de tratamiento, se aspiró el medio y se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % en PBS. Se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con PBS. Una vez fijadas, se permeabilizaron con PBS con el 0,1 % de Tritón X-100 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con tampón de bloqueo: BSA al 1 %, glicina a 22,52 mg/ml en PBS con el 0,1 % de Tween 20 (PBS-T). A continuación, se añadió el anticuerpo de conejo anti-citoqueratina 17 diluido en el tampón de dilución (PBS-T con BSA al 1 %) a una concentración de 1 : 500, que se incubó toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se lavó la placa y se añadió el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo Alexa Fluor® 647 a una dilución de 1 : 1000 en el tampón de dilución. Se incubó una hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido ese tiempo, se lavó la placa y se añadieron los colorantes Hoechst 33342 y Phalloidin Atto Alexa Fluor® 565 diluidos en PBS a 1 : 4000 y 1 : 400, respectivamente. Se incubaron 30 minutos y se lavaron con PBS.

Posteriormente, se procedió a la toma de imágenes en el microscopio de alto contenido Operetta™. Se utilizaron un objetivo de 20 aumentos y 5 campos por pocillo.

Se eligieron cuatro canales para la toma de fotografías, cuya compatibilidad se comprobó con la aplicación SpectraViewer® (**figura 17**): un campo claro (*brightfield*); un canal de excitación a 630 nm y emisión a 660 nm (Alexa Fluor® 647), para la citoqueratina 17; un canal de excitación a 350 nm y emisión a 445 nm, para los núcleos celulares (Hoechst); y un canal de excitación a 570 nm y emisión a 615 nm para marcar el citoesqueleto con faloidina (Alexa Fluor® 565).

Para el análisis de imagen se utilizó el programa Harmony® (Perkin Elmer). Se extrajeron los datos de intensidad total de fluorescencia en la célula Alexa Fluor® 647 (que se corresponde con el marcaje de la citoqueratina-17) y se calculó el ratio entre la intensidad de fluorescencia y el número de células de cada pocillo.

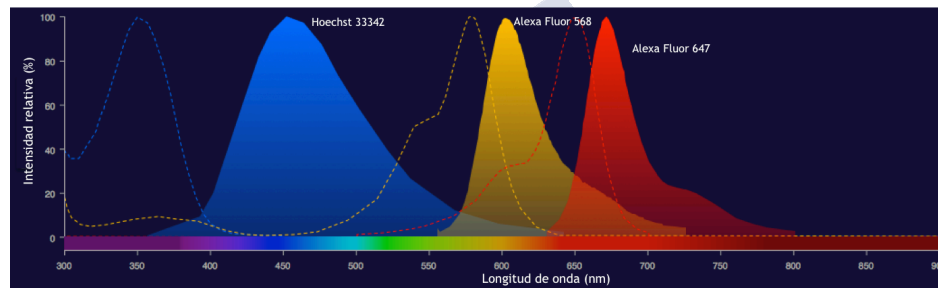


Figura 17. Espectros de excitación (líneas de puntos) y emisión (líneas continuas) de los distintos marcajes fluorescentes utilizados para la obtención de imágenes de microscopía de los queratinocitos HaCaT mediante SpectraViewer®.

9. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE QUIMIOQUINAS Y PROTEÍNAS DE LA CASCADA INFLAMATORIA DE IL-17RA

9.1. Expresión genética de quimioquinas y proteínas de la cascada inflamatoria de IL-17RA mediante Taqman®

La RT-qPCR (reacción en cadena de la polimerasa inversa a tiempo real) es una de las técnicas de análisis de expresión génica más potentes y sensibles. Al medir la cantidad de ARN total de una muestra se puede cuantificar el nivel al que está expresando un gen determinado. Así, se monitoriza a tiempo real la cantidad de ARN amplificado (previa transcripción inversa a ADNc), mediante su marcaje fluorescente: el incremento de esta señal será proporcional a la cantidad de ADN producida en cada ciclo de PCR, que se amplifica de forma exponencial (211). Como referencia se suele utilizar un gen de expresión constitutiva, que es el resultado de la interacción entre la ARN polimerasa y el promotor, sin necesidad de regulación adicional. Dichos genes se caracterizan por tener niveles de expresión constante en todas las células y condiciones de un mismo organismo y, por lo tanto, son útiles para analizar los cambios en los niveles de expresión provocados por estímulos farmacológicos y genéticos.

La RT-qPCR contienen una molécula indicadora fluorescente (fluoróforo) que permite monitorizar la acumulación del producto PCR resultado de la transcripción inversa de una secuencia de ARN mensajero (ARNm) a ADN complementario (ADNc). Es el caso de la tecnología TaqMan® (212,213). Una sonda Taqman® contiene un fluoróforo unido al extremo 5' y un *quencher* no fluorescente en el extremo 3'. También puede presentar un *Minor Groove Binder* (MGB) en el extremo 3', que permite incrementar la temperatura de sin incrementar la longitud de la sonda (214,215).

La sonda Taqman® se une específicamente a una secuencia complementaria de ADNc entre los cebadores sentido y antisentido (**figura 18**). Esta no emite fluorescencia debido a la supresión ocasionada por la proximidad del *quencher* al fluoróforo. Cuando la ADN polimerasa corta la sonda hibridada al ADNc (actividad 5' nucleasa durante la fase de extensión) el fluoróforo se separa del *quencher*, lo que permite que el primero emita fluorescencia. Esto solamente ocurre si la secuencia de ADNc y la sonda son complementarias y se amplifican durante la PCR. Finalmente, la polimerización de la cadena continúa. Los fluoróforos se van liberando de sus respectivas sondas en cada ciclo, resultando en un incremento de intensidad de fluorescencia proporcional a la cantidad de amplicón producido y, en consecuencia, cuanto mayor sea el número de copias del ADNc diana, antes se producirá un incremento significativo en la fluorescencia que supera el umbral de detección. El ciclo de PCR en el que se supera el valor umbral definido se denomina C_T (212,213).

De esta manera, C_T es la herramienta cuantitativa empleada para la cuantificación de la expresión génica. Para ello, es necesario recurrir a un gen de referencia, que permanece invariable independientemente de las circunstancias biológicas. Es el caso de *36B4*, un gen que codifica una proteína constitutiva de la subunidad mayor del ribosoma (216,217). Este gen de referencia es fundamental en uno de los métodos más utilizados para las RT-qPCR, el método comparativo de C_T , también conocido como $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (212).

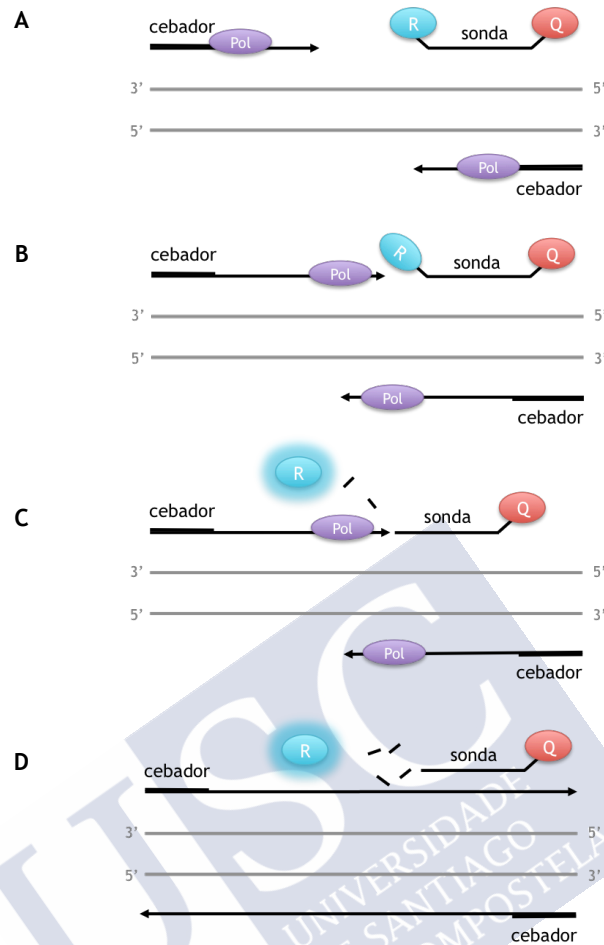


Figura 18. Fundamento de la tecnología Taqman® para la cuantificación de la expresión génica. La sonda Taqman® se une específicamente a una secuencia complementaria de ADNc entre los cebadores sentido y antisentido (A). Esta no emite fluorescencia debido a la supresión ocasionada por la proximidad del *quencher* al fluoróforo (B). Cuando la ADN polimerasa corta la sonda hibridada al ADNc, el fluoróforo se separa del *quencher*, lo que permite que el primero emita fluorescencia (C). Esta será proporcional al número de copias de ADNc. Finalmente, la polimerización de la cadena continúa (D). Imagen realizada por la autora.

9.2. Estimulación de vías inflamatorias, obtención de lisados y aislamiento y purificación de ARN

Se sembraron 500 000 células por pocillo de la línea celular HaCaT en medio DMEM GlutaMAX® complementado con un 10 % de FBS y un 1 % de penicilina-estreptomicina en una placa de 6 pocillos transparente estéril tratada para cultivo celular. Se incubaron 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, se añadieron los correspondientes estímulos proinflamatorios: control negativo sin estímulos; 100 ng/ml de IL-17A recombinante humana y 10 ng/ml de TNF α ; 100 ng/ml de IL-17A; o 10 ng/ml de TNF α . En el caso de las células HaCaT tratadas con 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α se utilizaron también los ligandos CBG040591 y CBG060392, así como el péptido anti-IL-17A (172) a concentraciones de 100 μ M y 1 μ M, respectivamente.

Tras 24 horas de incubación, se tripsinizaron las células y se sedimentaron mediante centrifugación a 1000 g durante 5 minutos. Se lavaron con PBS y se volvieron a sedimentar, y estas células se utilizaron para aislar ARN.

Para ello se empleó el RNeasy Mini Kit de Qiagen, que se basa en el empleo de columnas cromatográficas con una membrana de sílice que adsorbe las moléculas de ARN. En primer lugar, se añadió tampón de lisis RLT® al sedimento celular y se homogeneizó mediante aguja de 20 Gauge y jeringa. Se añadió etanol al 70 % y se mezcló por pipeteo. Esta mezcla se transfirió a la columna de purificación del kit y se centrifugó durante 15 segundos a 10 000 g. Se descartó el filtrado y se añadió tampón de lavado RW1® a la columna, que se centrifugó en las mismas condiciones que el caso anterior. Se añadió tampón de lavado RPE® dos veces, ambas sucedidas por una centrifugación de 15 segundos y 2 minutos, respectivamente. Posteriormente, se cambió el tubo recolector de la columna por uno limpio y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto para eliminar posibles restos de tampones de lavado. Finalmente, se añadieron 40 μ l de agua libre de RNasas para eluir el

ARN, y se centrifugó la columna durante 1 minuto a 10 000 g. Se determinó la concentración de ARN mediante un espectofotómetro de microvolúmenes NanoDrop 2000™, y este ARN purificado se conservó a -80 °C.

9.3. RT-qPCR de *CCL20* y *CXCL8*, *CEBPB* y *ZC3H12A*

Para llevar a cabo la cuantificación de la expresión de ARN de las citoquinas proinflamatorias *CCL20* y *CXCL8* y de las proteínas de la cascada inflamatoria C/EBP β y Regnasa-1 (*ZC3H12A*) en las células HaCaT tratadas previamente se empleó el kit EXPRESS One-Step SuperScrip® RT-qPCR de Invitrogen. Este proporciona los componentes necesarios para realizar en un solo paso la transcripción inversa, es decir, la síntesis de ADNc a partir del ARN purificado y una PCR cuantitativa (RT-qPCR).

Así, se emplearon los reactivos del kit Express superscript qPCR supermix universal, Express superscript mix for one step qPCR y ROX (colorante de referencia). También se utilizaron dos cebadores y una sonda del gen humano de referencia *36B4* marcada con VIC™ (que codifica la proteína 36B4), y las sondas TaqMan® correspondientes marcadas con amidita de fluoresceína (FAM): *CCL20* (Hs00355476_m1), *CXCL8* (Hs00174103_m1), *CEBPB* (Hs00270923_s1) y *ZC3H12A* (Hs00962356_m1).

En una placa MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate se añadieron 9 μ l de la mezcla de reactivos mencionada con el volumen de reacción para 10 μ l que se detalla en la **tabla 2**. Se añadió 1 μ l del ARN correspondiente: control negativo; 100 ng/ml de IL-17A con 10 ng/ml de TNF α ; IL-17A; TNF α ; o IL-17A y TNF α en presencia de los ligandos CBG040591, CBG060392 o el péptido anti-IL-17A.

Tabla 2. Componentes de la reacción para la cuantificación de la expresión de *CCL20*, *CXCL8*, *CEBPB* y *ZC3H12A* en células HaCaT mediante RT-qPCR (volumen final de 10 µl).

Componente	Volumen (µL)
Cebador 1 <i>36B4</i>	0,2
Cebador 2 <i>36B4</i>	0,2
Sonda <i>36B4</i> - VIC	0,02
Express superscript qPCR supermix universal	5
Express superscript mix for one step qPCR	1
Colorante Rox	0,04
Sonda TaqMan - FAM	0,5
Agua ultrapurificada estéril	2,04

Una vez añadidas las muestras de ARN y la mezcla de la sonda correspondiente (*CCL20*, *CXCL8*, *CEBPB* o *ZC3H12A*) a la placa, esta se cubrió con una lámina adhesiva MicroAmp™ Optical Adhesive Film y se centrifugó para asegurar que todo el líquido se encontraba en el fondo del pocillo.

La placa se introdujo en el instrumento QuantStudio® 12K Flex Real-Time PCR y se utilizó el protocolo diseñado para los ensayos. Así, se incluyeron las sondas *36B4*-VIC (*quencher* TAMRA), *CCL20*-FAM (*quencher* MGB) y *CXCL8*-FAM (*quencher* MGB). En el caso de la determinación de *CEBPB* se incluyeron las sondas *36B4*-VIC (*quencher* TAMRA) y *CEBPB*-FAM (*quencher* MGB); y en el de la expresión de Regnasa-1 las sondas utilizadas fueron *36B4*-VIC (*quencher* TAMRA) y *ZC3H12A*-FAM (*quencher* MGB).

Los tiempos y temperaturas para la PCR a tiempo real fueron los siguientes: 15 minutos a 50 °C (tiempo para la transcripción inversa del ARN); 20 segundos a 95 °C; y 40 ciclos de 3 segundos a 95 °C y 30 segundos a 60 °C.

9.4. Análisis y procesamiento de los datos de expresión génica

Para cuantificar la expresión de *CCL20*, *CXCL8*, *CEBPB* y *ZC3H12A* se utilizó el parámetro ΔC_T , que se obtuvo a partir del programa informático de QuantStudio® 12K Flex Real-Time PCR. Este indica la diferencia entre el número de ciclos en los que la señal fluorescente de las sondas marcadas con FAM superó el umbral (sonda para los genes *CCL20*, *CXCL8*, *CEBPB* o *ZC3H12A*) y el número de ciclos en los que el umbral fue superado por la sonda marcada con VIC (gen de referencia, *36B4*) (216,217).

Con el objetivo de cuantificar las variaciones debidas a la estimulación de las células HaCaT (en presencia o ausencia de compuesto o péptido) se empleó la diferencia de ΔC_T entre dos condiciones (siendo la condición control la de las células HaCaT no tratadas). Para el cálculo del parámetro que determina esta diferencia, $\Delta\Delta C_T$, se empleó el programa Microsoft Excel. El cambio en los niveles expresión se determinó mediante $2^{-\Delta\Delta C_T}$ según la siguiente ecuación (212):

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = [(C_{T_{gen}} - C_{T_{36B4}})]_{muestra} - [(C_{T_{gen}} - C_{T_{36B4}})]_{control\ negativo}$$

Para la comparación entre los datos de expresión de los distintos tratamientos de las células HaCaT se utilizó un análisis de varianza (ANOVA). La significación estadística se estableció en $\alpha = 0,05$.

10. EFECTO DE LOS LIGANDOS DE IL-17A/IL-17RA SOBRE LA SEÑALIZACIÓN INFLAMATORIA INTRACELULAR EN QUERATINOCITOS HUMANOS

10.1. Activación e inhibición de la inflamación de la señalización intracelular y preparación de lisados de queratinocitos humanos

Se sembraron células HaCaT en medio DMEM GlutaMAX® complementado con un 10 % de FBS y un 1 % de penicilina-estreptomicina en una placa de 100 mm de diámetro para cultivo celular. Se incubaron hasta obtener un 75 % de confluencia a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente, se añadieron los correspondientes estímulos proinflamatorios: control negativo sin estímulos; 100 ng/ml de IL-17A recombinante humana y 10 ng/ml de TNF α en ausencia o presencia de los ligandos CBG040591 o CBG060392 a concentraciones de 100 μ M.

Tras la mencionada incubación, se lavaron con PBS frío y se despegaron las células con ayuda de un rascador en presencia de 1 ml de tampón de lisis: 1 ml de tampón RIPA con un 1 % de PMSF, un 1 % de ortovanadato de sodio, un 1 % del cóctel de inhibidores de proteasas, y un comprimido de inhibidores de fosfatasa PhosSTOP™ por cada 10 ml de tampón de lisis.

Los lisados se introdujeron en un agitador orbital durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 16099 g (12 000 rpm) durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se conservó a -80 °C.

10.2. Determinación de NF- κ B p65 e I κ B α totales y fosforiladas mediante estudios de Western blot

Se cuantificó la cantidad de proteína de los lisados de células HaCaT mediante el método de Lowry modificado con el ensayo de proteínas DC™ de Bio-Rad.

Se añadieron 10 μ g de proteína total a un gel Bolt™ 4-12 % Bis-Tris Plus. Previamente se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 minutos en tampón de carga BOLT™ LDS 4X. Posteriormente, se llevó a cabo la separación de proteínas mediante electroforesis en tampón 20X Bolt™ MES SDS a 135 V durante 50 minutos.

La membrana Immun-Blot® PVDF Membrane se activó en metanol durante un minuto. Tanto el gel de proteínas como la membrana se sumergieron en tampón de transferencia Towbin modificado. La transferencia semi-seca de las proteínas del gel a la membrana de transferencia se produjo a 15 V constantes durante 90 minutos.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con TBS-T y se bloqueó con BSA al 5 % en TBS-T durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. La membrana se volvió a lavar con TBS-T y se incubó en agitación con uno de los anticuerpos primarios indicados en la **tabla 3** a 4 °C durante toda la noche. Se empleó como control de carga el anticuerpo anti-tubulina ligado a HRP a una dilución de 1 : 20 000. Una vez transcurrido este tiempo, la membrana se volvió a lavar con TBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (**tabla 3**) ligado a HRP durante una hora a temperatura ambiente.

A continuación, la membrana se lavó con TBS-T. Se añadió el reactivo quimioluminiscente de detección (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent) y se incubó durante un minuto. Para su revelado se emplearon las películas fotográficas de Amersham Hyperfilm ECL y los reactivos revelador y fijador GBX de Carestream Kodak®.

Tabla 3. Anticuerpos y concentraciones utilizadas en la determinación de NF- κ B p65 e I κ B α totales y fosforiladas.

Anticuerpos primarios	Especie	Dilución
NF- κ B p65	conejo	1 : 1000
fosfo-NF- κ B p65 (Ser536)	conejo	1 : 1000
I κ B α	ratón	1 : 1000
fosfo-I κ B α (Ser32)	conejo	1 : 1000
Anticuerpos secundarios		Dilución
anti-conejo ligado a HPR		1 : 5000
anti-ratón ligado a HPR		1 : 5000

10.3. Análisis y procesamiento de datos de expresión mediante Western blot

Se empleó el programa informático ImageJ para cuantificar la densidad de las bandas en la membrana de Western blot.

Para la comparación entre las bandas de los distintos tratamientos de las células HaCaT se utilizó un análisis de varianza (ANOVA). La significación estadística se estableció en $\alpha = 0,05$.





RESULTADOS



RESULTADOS

1. IDENTIFICACIÓN DE LIGANDOS MEDIANTE ESTUDIOS DE UNIÓN IN SILICO

Con el objetivo de identificar ligandos que bloqueen la unión de la interleuquina 17A a la subunidad A de su receptor se utilizaron estudios *in silico*. Esto permitiría obtener una quimioteca focalizada para realizar un cribado mediante un ensayo primario.

Para ello, los 60 000 compuestos disponibles en la quimioteca del grupo BioFarma se probaron sobre las nueve estructuras existentes en la base de datos PDB en el momento de realizar el estudio: 2VXS, 4HR9, 4HSA, 4QHU, 5HHV, 5HHX, 5HI3, 5HI4 y 5HI5. Tras haber realizado el estudio de unión global de todas las moléculas y la descripción de sus correspondientes interacciones con las proteínas de cada estructura, se obtuvieron 67 *hits*, al establecer un umbral de energía de afinidad (AE) de -8,8 kcal/mol (se muestra una selección de los ligandos con el mayor número de dianas y la menor energía de afinidad en la **tabla 4**). Dichos *hits* se consideraron potenciales ligandos de la interleuquina 17A y/o de su receptor y, en consecuencia, podrían ser ligandos de la interacción entre estas dos proteínas.

Tabla 4. Selección de los 12 ligandos con el mayor número de dianas y con la menor energía de afinidad (AE) (kcal/mol).

Ligando	Diana PDB	AE	Ligando	Diana PDB	AE
CBG007144	4HSA	-11,9	CBG019847	5HI3	-11,9
	5HI5	-12,3		4HR9	-10,3
	5HI3	-11,7	CBG019904	5HI3	-12,0
CBG012320	4HSA	-11,3		5HI5	-11,8
	5HI5	-13,0	CBG019927	4HSA	-11,3
	5HI3	-12,4		5HI5	-11,8
	4HR9	-10,5	CBG026394	4HSA	-11,7
CBG013062	5HI3	-11,9		5HI5	-11,8
	4HSA	-11,6		5HI3	-12,5
CBG013140	5HI5	-12,7	CBG026603	4HSA	-11,6
	5HI3	-11,9		5HI3	-11,9
CBG013151	5HI3	-12,1		5HI5	-12,1
	5HI5	-12,4	CBG028684	4HSA	-12,3
CBG019512	5HI5	-11,8		5HI3	-15,0
	5HI3	-11,9		5HI5	-12,7

2. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA UNIÓN DE LOS LIGANDOS A IL-17A/IL-17RA MEDIANTE MÉTODOS BIOFÍSICOS

2.1. Obtención del reactivo biológico necesario para la realización de ensayos biofísicos

Con el objetivo de emplear IL-17A en los ensayos biofísicos, se desarrolló un método de expresión de IL-17A humana recombinante en células de mamífero (HEK 293) en el que se secreta dicha proteína al sobrenadante y posteriormente se purifica mediante cromatografía de afinidad. El resultado de la purificación de esta fracción proteica se muestra en un Western blot, en el que se observa la presencia de IL-17A monomérica y dimerica, con pesos moleculares alrededor de 17 y 34 kDa, respectivamente (**figura 19**).

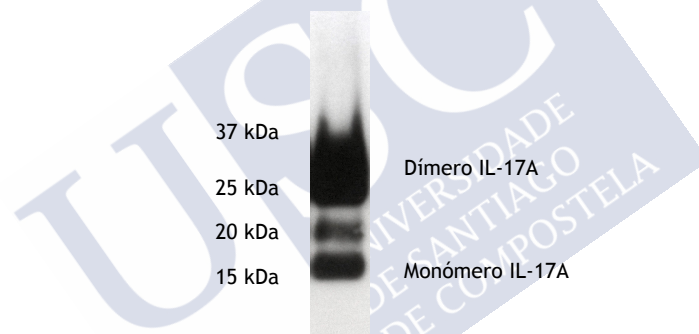


Figura 19. Expresión de IL-17A humana recombinante en el sobrenadante de células HEK 293. Se muestra una imagen representativa de dos experimentos independientes.

2.2. Desarrollo de un ensayo de redistribución dinámica de masas (DMR)

Para confirmar que los ligandos potenciales identificados mediante cribado virtual se unen físicamente a la citoquina y/o el receptor (IL-17A/IL-17RA), se desarrolló un ensayo de redistribución dinámica de masas dirigido a la proteína de fusión humana recombinante IL-17RA ECD Fc. En primer lugar, se comprobaron las señales de inmovilización de la proteína mediante acoplamiento a grupos amino en la placa EnSpire-LFB® empleando para ello una serie de tampones con distintos pH (**figura 20**). Un valor de inmovilización superior al rango entre 1000 y 1500 pm se considera adecuado para poder evaluar la unión de ligandos a la proteína inmovilizada.

Se observó que el tampón acetato de sodio 20 mM a pH 5,5 producía un valor de inmovilización superior a los demás, por lo que se seleccionó como tampón de inmovilización (**figura 20**). Esto es consistente con el punto isoeléctrico teórico de IL-17RA ECD, que es 5,9 y, por lo tanto, estaría cargado positivamente a un pH de 5,5, lo que permitiría su inmovilización sobre los grupos carboxilo de la placa EnSpire-LFB®.

Una vez determinado el tampón adecuado (acetato de sodio 20 mM a pH 5,5), se probaron distintas concentraciones de proteína IL-17RA ECD para evaluar si existía una relación directa entre su concentración y el nivel de inmovilización. Se seleccionó inicialmente la concentración de 25 µg/ml como suficiente para obtener valores de inmovilización superiores al rango comprendido entre 1000 y 1500 pm (**figura 20**) sin llegar a valores maximales que pudiesen dar lugar a artefactos.

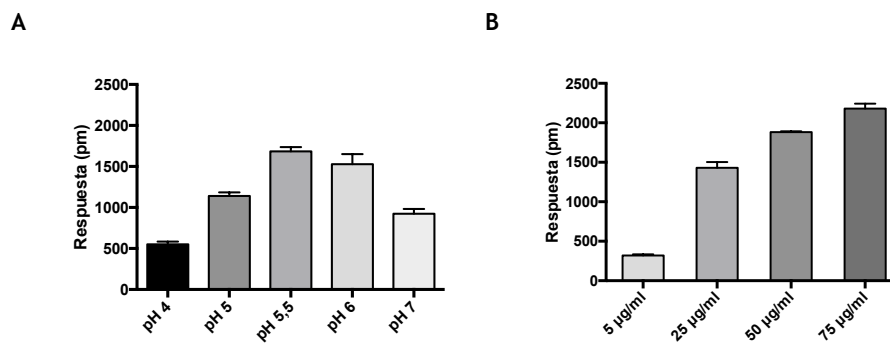


Figura 20. Desarrollo de un ensayo de redistribución dinámica de masas para identificar ligandos de IL-17RA. **(A)** Inmovilización de IL-17RA ECD Fc a 25 µg/ml con tampones de inmovilización a distintos pH. **(B)** Inmovilización de distintas concentraciones de IL-17RA ECD Fc a pH 5,5. Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

Con el objetivo de confirmar si este ensayo de redistribución dinámica de masas es apropiado para determinar la potencia de unión de los ligandos al receptor se utilizó su ligando endógeno, la citoquina IL-17A, como referencia. De esta manera, se obtuvo una señal de unión para IL-17A proporcional a la concentración, lo que permitió seleccionar la mínima concentración del preparado de proteínas enriquecido en IL-17A que produce una respuesta máxima, es decir, 1,7 µM en el tiempo definido inicialmente de 60 minutos (**figura 21**). Asimismo, debido a que las medidas de la distribución dinámica de masas se realizan en cinética, se obtuvo la representación de la cinética de unión entre ambas proteínas (**figura 22**). Así, se demostró que IL-17A se une al dominio extracelular del receptor IL-17RA con una K_D de $0,91 \pm 0,21$ µM y, en consecuencia, se estableció como control positivo de unión en el ensayo de redistribución dinámica de masas (**tabla 5**).

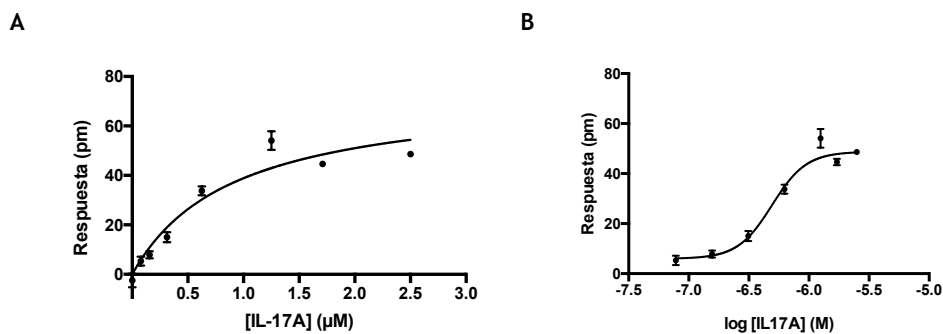


Figura 21. Respuesta de la unión de IL-17A a IL-17RA ECD Fc inmovilizado a 25 μg/ml en un ensayo de redistribución dinámica de masas. (A) Ajuste hiperbólico (donde X es la concentración) (B) Ajuste sigmoideo (donde la concentración se muestra en escala logarítmica). Se representa la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Tabla 5. Respuesta máxima de redistribución dinámica de masas (R_{\max}) y constante de disociación en el equilibrio (K_D) de IL-17A sobre IL-17RA ECD Fc inmovilizado. Los datos representan la media ± EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

	R_{\max} (pm)	K_D (μM)
IL-17A	$74,2 \pm 8,14$	$0,91 \pm 0,21$

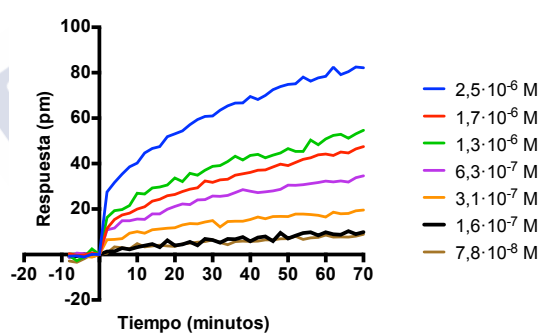


Figura 22. Respuesta cinética de la unión de IL-17A a IL-17RA ECD Fc inmovilizado en un ensayo de DMR, a distintas concentraciones de IL-17A (M). Se muestra la media de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

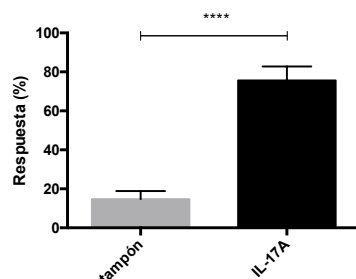
2.3. Priorización de los ligandos mediante un ensayo de redistribución dinámica de masas

Una vez optimizado el ensayo de distribución dinámica de masas para IL-17RA ECD Fc, se evaluaron los 67 compuestos identificados en el cribado virtual mediante un ensayo DMR con dos lecturas diferentes (basal y final), a una concentración de 20 μ M (**figura 23**).

El valor de inmovilización obtenido para IL-17RA ECD Fc fue de 1546 pm. La relación entre señal específica (IL-17A a 1,7 μ M) y señal de fondo (tampón de ensayo) fue de 5,13 y el valor de Z' fue de 0,47. Se obtuvieron los coeficientes de variación de los controles negativo (tampón de ensayo) y positivo (IL-17A) (**figura 23**). Dichos parámetros estadísticos se consideraron aceptables para este tipo de ensayos de cribado. El umbral de unión para la selección de *hits* se estableció en la media de los valores del grupo de compuestos ensayados más dos desviaciones estándar de la media.

Con estos requisitos, se identificaron dos compuestos como potenciales ligandos del par IL-17A/IL-17A que superan el umbral establecido para su selección. Se trata de dos moléculas con estructuras químicas diferentes, que pertenecen a la familia química de las quinazolinonas (CBG040591) y las pirrolidinadionas (CBG060392), respectivamente. Sus porcentajes de unión a la subunidad A del receptor fueron del 70,2 % y del 64,3 % comparados con IL-17A (**tabla 6**).

A



Inmovilización IL-17RA ECD Fc	1546 pm
CV control positivo (IL-17A)	19,2 %
CV blanco (tampón)	19,8 %
Señal específica/fondo	5,13
Z'	0,47

B

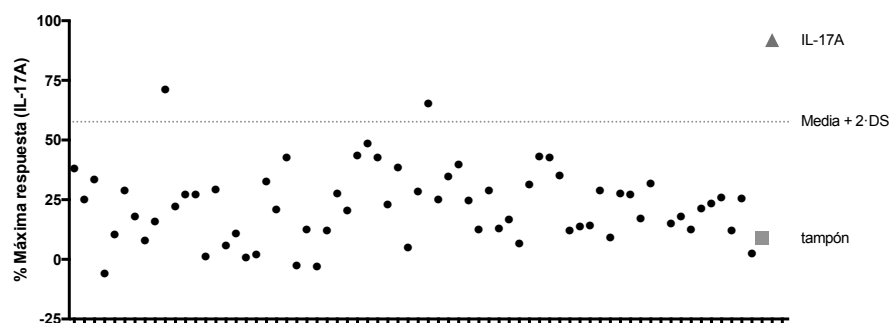
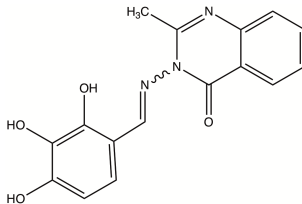
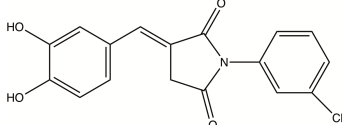


Figura 23. Cribado de 67 compuestos a una concentración de 20 μM mediante redistribución dinámica de masas. Se inmovilizó IL-17RA ECD Fc a 25 $\mu\text{g/ml}$. (A) Relación entre señal específica (IL-17A) y señal de fondo (tampón de ensayo) para el cribado de compuestos frente a IL-17RA ECD Fc en un ensayo de redistribución dinámica de masas. Los datos representan la media \pm desviación estándar (DS). (B) Se identificaron dos *hits* que superaron el umbral (media + 2 veces DS). Los datos se representan como porcentaje de la respuesta máxima de IL-17A. El control positivo (IL-17A) se representa como un triángulo y el negativo (tampón de ensayo) como un cuadrado. **** $p < 0,0001$ (test t de Student).

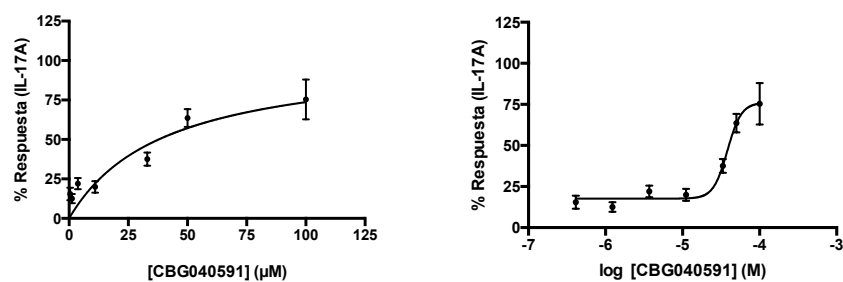
Tabla 6. Porcentaje de actividad y estructura de los dos *hits* identificados en el ensayo de redistribución dinámica de masas. Los valores corresponden al porcentaje de respuesta en relación a la actividad máxima de IL-17A.

Compuesto	Estructura	% Actividad
CBG040591		70,2
CBG060392		64,3

2.4. Caracterización de la actividad farmacológica de los *hits* mediante DMR

Los dos *hits* (CBG040591 y CGB060392) se caracterizaron mediante curvas concentración-respuesta (con concentraciones entre 0,4 μM y 100 μM) en las mismas condiciones de ensayo de redistribución dinámica de masas que las seleccionadas para el cribado. CBG040591 y CBG060392 se definieron como ligandos del dominio extracelular de IL-17RA con una B_{max} de $103 \pm 19,2 \%$ y $74,8 \pm 17,7 \%$, y una K_D de $40,4 \pm 16,4 \mu\text{M}$ y $19,4 \pm 13,0 \mu\text{M}$, respectivamente. No obstante, tanto CBG040591 como en el de CBG060392 parecen presentar un cierto grado de unión inespecífica a concentraciones altas, por lo que sus constantes de disociación (K_D) probablemente no puedan determinarse de forma exacta utilizando esta clase de ensayo (**figura 24**) (**tabla 7**). Asimismo, se obtuvieron representaciones de la cinética de unión de ambas moléculas al receptor (**figura 25**).

A



B

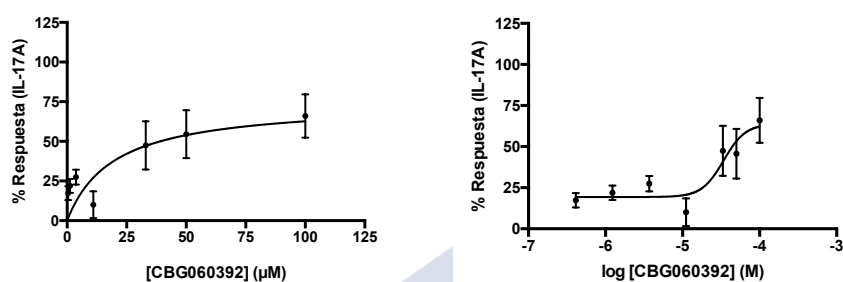


Figura 24. Respuesta de la unión de los compuestos *hit* a IL-17RA ECD Fc inmovilizado a $25 \mu\text{g/ml}$ en un ensayo de redistribución dinámica de masas (CBG040591 en A y CBG060392 en B). Se representa la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado con un ajuste hiperbólico (donde X es la concentración) y uno sigmoideo (donde la concentración se representa en escala logarítmica) para cada compuesto.

Tabla 7. Unión máxima de redistribución dinámica de masa (B_{max}) normalizada a la de IL-17A y constante de disociación en el equilibrio (K_D) de los compuestos *hit* a IL-17RA ECD Fc inmovilizado. Los datos representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado.

	B_{max} (% IL-17A)	K_D (μM)
CBG040591	$103 \pm 19,2$	$40,4 \pm 16,4$
CBG060392	$74,8 \pm 17,7$	$19,4 \pm 13,0$

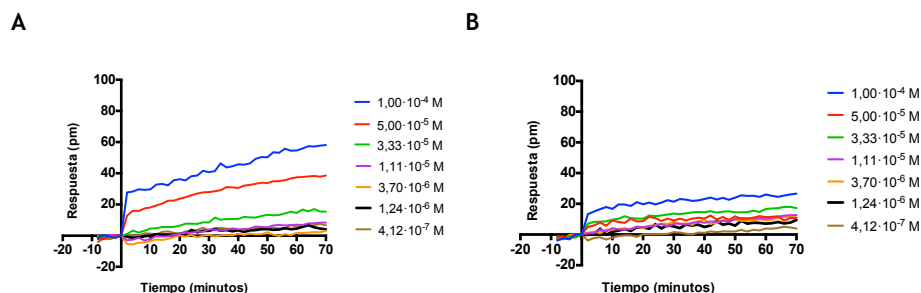


Figura 25. Respuesta cinética de la unión de CBG040591 y CBG060392 a IL-17RA ECD Fc inmovilizado a 25 µg/ml en un ensayo de redistribución dinámica de masa, a distintas concentraciones (M). Se muestra la media de un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

2.5. Determinación de la actividad farmacológica de los ligandos mediante un ensayo de resonancia de plasmones superficiales

Los ligandos CBG040591 y CBG060392, cuya actividad farmacológica se caracterizó en un ensayo de DMR, se validaron mediante resonancia de plasmones superficiales. Esta tecnología se empleó para determinar su la afinidad en la unión al receptor y poder comparar los resultados obtenidos con los adquiridos mediante redistribución dinámicas de masas.

Ambas moléculas se caracterizaron mediante curvas concentración-respuesta (entre 0,08 µM y 0,50 µM) con un protocolo similar al utilizado en el ensayo de redistribución dinámica de masas. Se determinó su respuesta sobre IL-17RA ECD Fc inmovilizado en un chip CM5 a 10 000 RU (unidades de respuesta, *response units*) y con un tampón de inmovilización de acetato de sodio 10 mM a pH 5,5. Los ligandos mostraron una unión específica al dominio extracelular de IL-17RA, siendo CBG040591 más potente que CBG060392. Del mismo modo que en la determinación de DMR, en ambos casos se produce cierta unión inespecífica a concentraciones altas (superiores a 30-50 µM), dado que los valores tienden a incrementarse al hacerlo

las concentraciones de compuesto, en lugar de alcanzar un *plateau* de saturación (**figura 26**) (**tabla 8**). Así, se puede confirmar que ambos compuestos actúan como ligandos con potencia micromolar para el dominio extracelular de IL-17RA.

Asimismo, se obtuvieron representaciones de los sensorgramas de unión de los dos compuestos a IL-17RA ECD (**figura 27**). Ambos compuestos no se unieron a la proteína NUDT21, utilizada como control de especificidad (no se muestra).

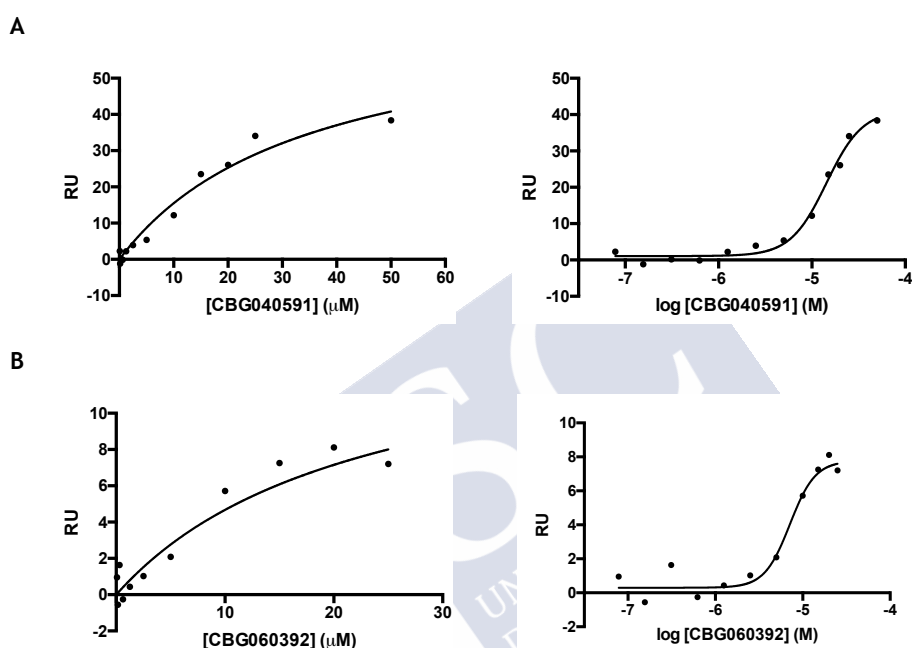


Figura 26. Respuesta de la unión de los compuestos *hit* a IL-17RA ECD Fc inmovilizado a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales (CBG040591 en A y CBG060392 en B). Los valores de RU mostrados son diferentes en cada eje. Se representa la media de dos experimentos independientes con un ajuste hiperbólico (donde X es la concentración) y uno sigmoideo (donde la concentración se representa en escala logarítmica) para cada compuesto.

Tabla 8. Constante de disociación en el equilibrio (K_D) de los ligandos en el ensayo de resonancia de plasmones superficiales. Los datos representan la media de dos experimentos independientes.

	K_D (μM)
CBG040591	$\approx 34,6$
CBG060392	$\approx 22,6$

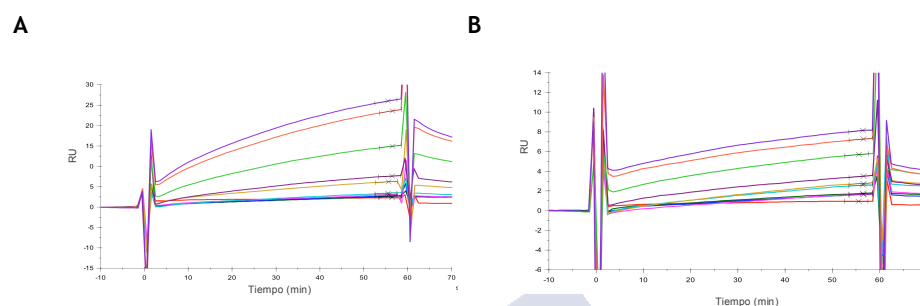


Figura 27. Sensorgramas de la respuesta cinética de la unión de CBG040591 (A) y CBG060392 (B) a IL-17RA ECD Fc inmovilizado sobre un chip CM5 en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales, a distintas concentraciones (M). Se muestra un experimento representativo de dos experimentos independientes.

3. MODELO DE INTERACCIÓN ESTRUCTURAL ENTRE LOS LIGANDOS E IL-17A/IL-17RA

Los ligandos CBG040591 y CBG060392 poseen la estructura química de una quinazolinona y de una pirrolidinadiona, respectivamente. Ambas moléculas se identificaron en el cribado virtual como potenciales ligandos de la estructura de PDB 4HSA, ya que superaron el umbral establecido de energía de afinidad (AE) de $-8,8$ kcal/mol. 4HSA es una estructura de dos complejos formados por el homodímero de IL-17A (cadenas A y B; D y E) que se une al dominio extracelular de IL-17RA (cadena C; F), estableciendo una

interacción relevante en el cambio conformacional necesario para completar el complejo citoquina-receptor (**figura 28**). Las energías de afinidad obtenidas fueron de -10,5 kcal/mol para CBG040591, y de -10,8 kcal/mol para CBG060392, indicando que tanto la quinazolinona como la pirrolidina-2,5-diona podrían unirse al complejo IL-17A/IL-17RA.

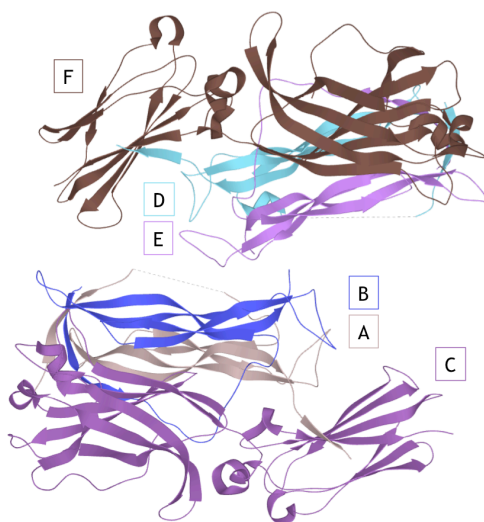


Figura 28. Estructura del complejo de dos homodímeros de IL-17A (cadenas A y B; D y E) con el dominio extracelular de IL-17RA (cadena C; F). Estructura 4HSA extraída de PDB (S. Liu et al., 2013).

El análisis de *docking* indica que se las interacciones entre CBG040591 y el complejo IL-17A/IL-17RA se producen sobre 26 aminoácidos: 20 correspondientes a la cadena C de 4HSA, que es el dominio extracelular de IL-17RA; y 6 correspondientes a la cadena B, que representa uno de los monómeros del dímero de IL-17A.

Asimismo, existen 4 interacciones de puentes de hidrógeno entre la molécula y la proteína diana (**tabla 9**) (**figura 29**).

Las interacciones entre el compuesto CBG060392 y el complejo IL-17A/IL-17RA se producen sobre 23 aminoácidos: 15 correspondientes a la cadena F del complejo 4HSA, que es el dominio extracelular de IL-17RA; e interaccionan con 8 de ellos correspondientes a la cadena E, que representa uno de los monómeros del dímero de IL-17A. Además, existen 3 puentes de hidrógeno entre la molécula y la proteína diana (**tabla 10**) (**figura 30**).

Los ligandos CBG040591 y CBG060392 no comparten el corazón de la estructura química, pero el modelo desarrollado en este trabajo predice su interacción dentro de las mismas áreas del complejo IL-17A/IL-17RA. De hecho, 10 de los aminoácidos a los que se unen las moléculas CBG040591 y CBG060392 son comunes a ambas (aminoácidos tanto pertenecientes a IL-17RA como a la IL-17A) y, por lo tanto, podrían ser residuos de fundamentales en estas interacciones ligando-proteína (**tabla 11**).

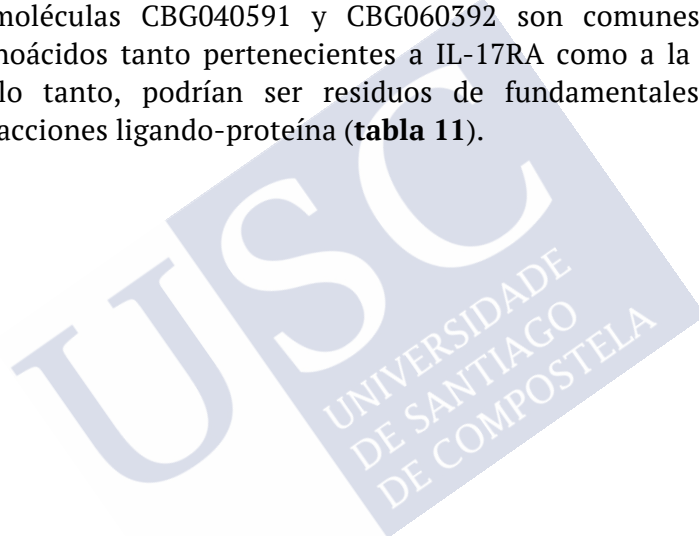


Tabla 9. Simulación de las interacciones entre el ligando CBG040591 y la estructura 4HSA, que representa el complejo IL-17A/IL-17RA.

Cadena proteica	Aminoácido	Átomo
Interacciones átomo - aminoácido		
IL-17RA (C)	Ile137	O
IL-17A (B)	Ser64	CB
IL-17A (B)	Pro59	CB
IL-17RA (C)	His131	NE2
IL-17RA (C)	Pro136	O
IL-17RA (C)	Ile137	C
IL-17RA (C)	Pro136	CB
IL-17RA (C)	Lys135	HZ2
IL-17RA (C)	His131	HE2
IL-17RA (C)	His131	CD2
IL-17RA (C)	Ser84	HG
IL-17A (B)	Arg101	HH12
IL-17RA (C)	Gly140	N
IL-17RA (C)	Lys135	NZ
IL-17RA (C)	Asp139	HN
IL-17A (B)	Ser64	HG
IL-17RA (C)	Pro136	C
IL-17RA (C)	Thr129	CG2
IL-17RA (C)	Trp31	CD1
IL-17RA (C)	Pro136	CG

Tabla 9 (cont)

Cadena proteica	Aminoácido	Átomo
IL-17A (B)	Ser64	OG
IL-17RA (C)	Gly140	HN
IL-17RA (C)	Ile137	O
IL-17A (B)	Arg101	HH12
IL-17RA (C)	Lys135	HZ2
IL-17RA (C)	Pro136	O

Cadena proteica	Aminoácido	Átomo
Puentes de hidrógeno		
IL-17RA (C)	Ile137	O
IL-17A (B)	Arg101	HH127
IL-17RA (C)	Lys135	HZ2
IL-17RA (C)	Pro136	O

Tabla 10. Simulación de las interacciones entre el ligando CBG060392 y la estructura 4HSA, que representa el complejo IL-17A/IL-17RA.

Cadena proteica	Aminoácido	Átomo
Interacciones átomo - aminoácido		
IL-17A (E)	Pro59	CB
IL-17RA (F)	Ile137	O
IL-17RA (F)	Pro138	CA
IL-17RA (F)	Thr129	CG2
IL-17RA (F)	Pro136	CG
IL-17RA (F)	Gly140	C
IL-17RA (F)	His131	NE2
IL-17A (E)	Arg101	NH1
IL-17A (E)	Ser64	HG
IL-17RA (F)	Ser84	HG
IL-17A (E)	Glu60	OE2
IL-17RA (F)	Lys135	HZ2
IL-17RA (F)	His131	HE2
IL-17RA (F)	Cys26	CB
IL-17RA (F)	Gly140	O
IL-17RA (F)	His131	CD2
IL-17A (E)	Arg101	HH11
IL-17RA (F)	Pro136	CB
IL-17A (E)	Val65	CG1
IL-17A (E)	Ser64	CB

Tabla 10 (cont)

Cadena proteica	Aminoácido	Átomo
IL-17RA (F)	Lys135	HZ2
IL-17RA (F)	Gly140	O
IL-17A (E)	Arg101	HH11

Cadena proteica	Aminoácido	Átomo
Puentes de hidrógeno		
IL-17RA (F)	Lys135	HZ2
IL-17RA (F)	Gly140	O
IL-17A (E)	Arg101	HH11



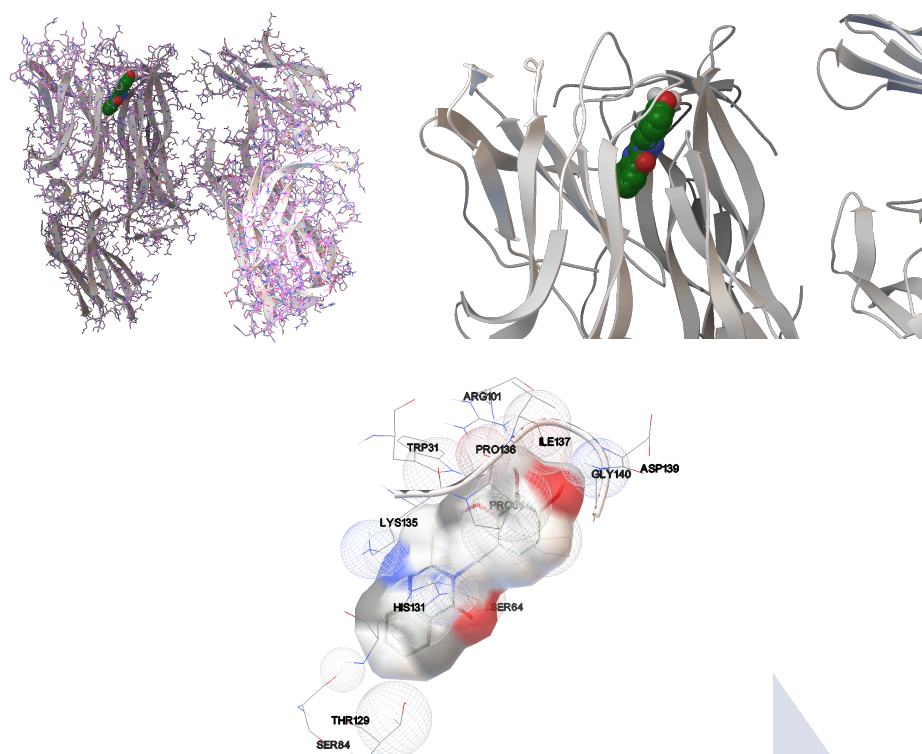


Figura 29. Representación 3D de la unión y los aminoácidos que participan en la misma del compuesto CBG040591 al complejo formado dos homodímeros de IL-17A y el dominio extracelular de IL-17RA.

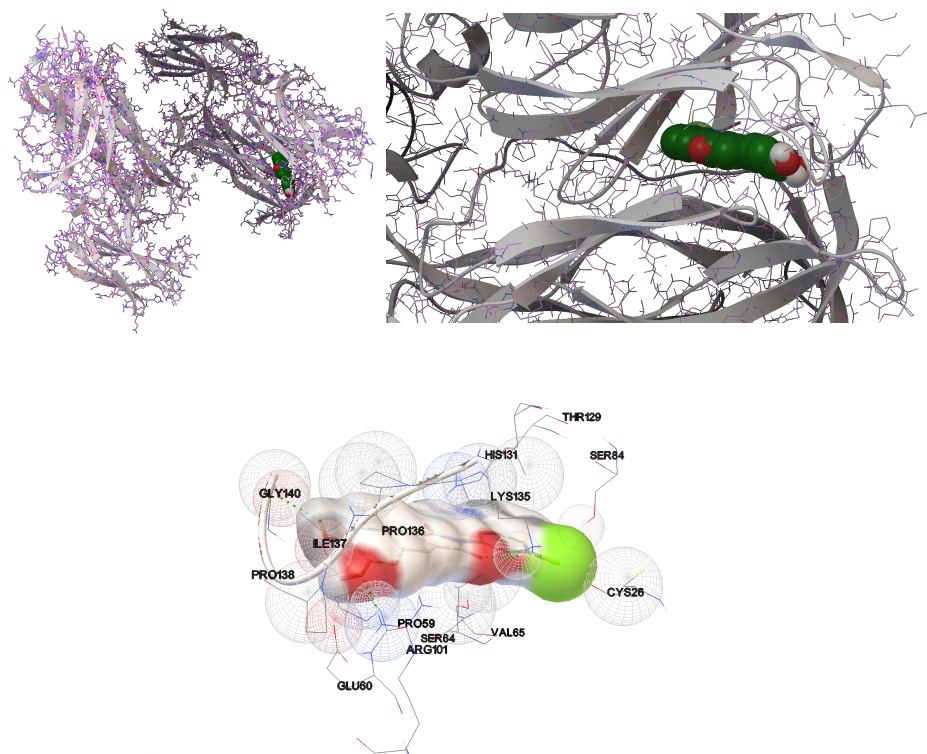


Figura 30. Representación 3D de la unión y los aminoácidos que participan en la misma del compuesto CBG060392 al complejo formado dos homodímeros de IL-17A y el dominio extracelular de IL-17RA.

Tabla 11. Residuos aminoacídicos comunes a las interacciones entre los compuestos CBG040591 o CBG060392 y el complejo IL-17A/IL-17RA de la estructura 4HSA de PDB.

Cadena proteica	Aminoácido	Átomo
Interacciones átomo - aminoácido		
IL-17A	Pro59	CB
IL-17RA	Ile137	O
IL-17RA	Pro138	CA
IL-17RA	Pro136	CG
IL-17RA	Lys135	HZ2
IL-17RA	Gly140	C
IL-17RA	His131	NE2
IL-17A	Arg101	NH1
IL-17A	Ser64	HG
IL-17RA	Ser84	HG

4. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS LIGANDOS SOBRE LA LIBERACIÓN DE QUIMIOQUINAS MEDIADA POR IL-17

4.1. Desarrollo de un ensayo de liberación de quimioquinas proinflamatorias en células tumorales de colon

Se desarrolló un ensayo de liberación de quimioquinas en respuesta a la estimulación proinflamatoria de IL-17A en la línea celular de adenocarcinoma colorrectal HT-29. La quimioquina determinada en respuesta a esta inflamación fue CXCL1 (también denominada GRO α), una de las quimioquinas diana que se liberan en condiciones de inflamación mediada por IL-17A.

Las células HT-29 se estimularon con concentraciones crecientes de IL-17A (en un rango entre 3,13 y 400 ng/ml) durante 24 horas, de modo que respondieron con un incremento de la liberación de CXCL1 en el sobrenadante proporcional a la cantidad de estímulo (**figura 31**). De esta manera, se obtuvo una curva de respuesta a IL-17A, que permitió seleccionar 50 ng/ml como la concentración adecuada para estimular las células HT-29 y poder identificar una respuesta inhibidora de un ligando farmacológico.

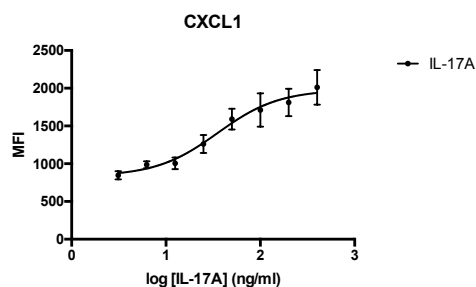


Figura 31. Liberación de CXCL1 en respuesta a concentraciones crecientes de IL-17A en la línea celular tumoral de colon HT-29. Se representa la media \pm EEM de la intensidad mediana de fluorescencia (MFI) de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Una vez determinada la concentración adecuada de IL-17A para producir una respuesta de CXCL1 medible en las células HT-29 se empleó el péptido anti-IL-17A IHVTIPADLWDWINK (172). Este se utilizó como referencia para inhibir la liberación de CXCL1 provocada por IL-17A. Para caracterizar dicha actividad inhibitoria se generaron curvas concentración-respuesta, con un rango de concentraciones entre 7,8 nM y 1000 nM, obteniendo un valor de IC_{50} de $206,1 \pm 119,4$ nM. Dicho bloqueo de la respuesta inflamatoria inducida por IL-17A fue, además, total, como se evidencia en los datos del porcentaje de reducción de esta actividad inflamatoria (**figura 32**) (**tabla 12**). Así, se confirmó la capacidad del ensayo para caracterizar los ligandos CBG040591 y CBG060392.

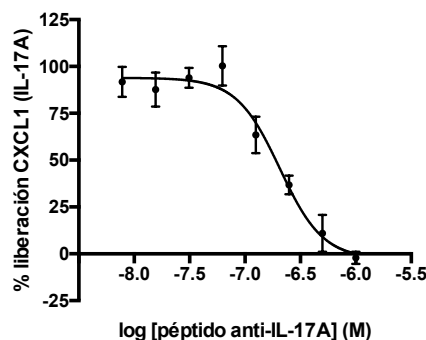


Figura 32. Inhibición de la liberación de CXCL1 producida por IL-17A (50 ng/ml) en respuesta a concentraciones crecientes del péptido IHVTIPADLWDWINK en la línea celular tumoral de colon HT-29. Se representa la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Tabla 12. Respuesta inhibitoria del péptido anti-IL-17A (IC_{50} y porcentaje de reducción sobre la respuesta máxima de IL-17A) sobre la liberación de CXCL1 en las células HT-29 normalizada a la liberación producida por IL-17A. Los datos representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

	IC_{50} (nM)	Reducción respuesta máxima (%)
Péptido	$206,1 \pm 119,4$	$-2,8 \pm 10,8$

4.2. Evaluación de la actividad farmacológica de los ligandos sobre la liberación de CXCL1 mediada por IL-17A en células tumorales de colon

Se determinó la actividad de los ligandos sobre la liberación de CXCL1 inducida por IL-17A mediante curvas concentración-respuesta. Para ello, se estimularon las células HT-29 con IL-17A a 50 ng/ml en presencia de concentraciones crecientes de compuesto entre 1,56 μ M y 100 μ M.

Ambos compuestos (CBG040591 y CBG060392) inhibieron la liberación de CXCL1 con una actividad dependiente de la concentración. La reducción de la respuesta máxima de IL-17A producida por ambos ligandos fue casi completa (hasta un 3,8 % o un 16,8 % para CBG040591 y CBG060392, respectivamente) (**figura 33**) (**tabla 13**).

Así, CBG040591 y CBG060392 bloquean la respuesta inflamatoria de IL-17 en células tumorales de colon.

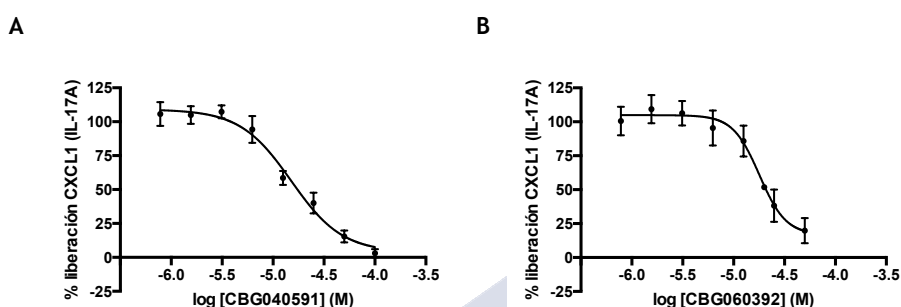


Figura 33. Inhibición de la liberación de CXCL1 producida por IL-17A (50 ng/ml) en respuesta a concentraciones crecientes de los compuestos CBG040591 (A) y CBG060392 (B) en la línea celular tumoral de colon HT-29. Se representa la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

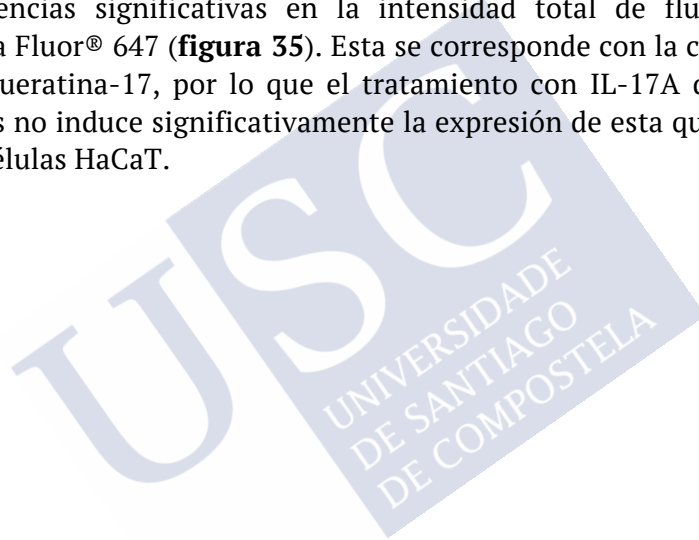
Tabla 13. Respuesta inhibitoria de los compuestos CBG040591 y CBG060392 (IC_{50} y porcentaje de reducción sobre la respuesta máxima de IL-17A) sobre la liberación de CXCL1 en las células HT-29 normalizada a la liberación producida por IL-17A. Los datos representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

	IC_{50} (μ M)	Reducción respuesta máxima (%)
CBG040591	15,1 \pm 12,2	3,8 \pm 12,7
CBG060392	17,9 \pm 11,9	16,8 \pm 12,9

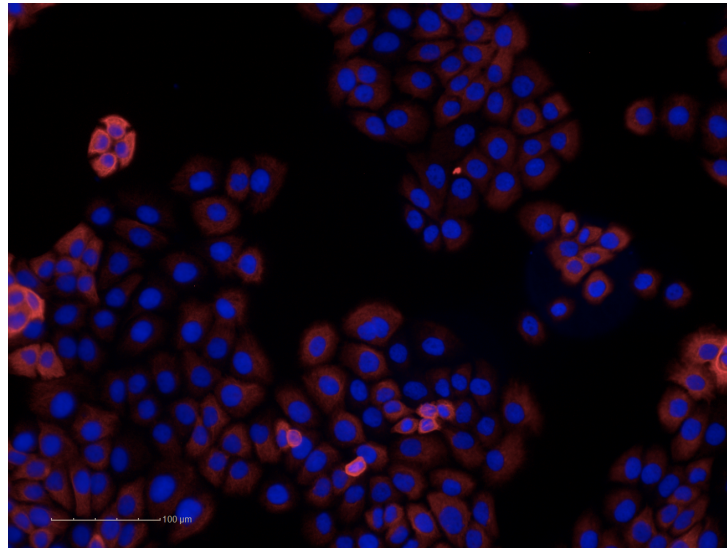
4.3. Las células HaCaT pueden utilizarse como un modelo de piel *in vitro*

Para comprobar la morfología y la expresión de citoqueratinas en la línea celular de queratinocitos HaCaT se tomaron imágenes mediante microscopía de alto contenido. Así, se observó la expresión de citoqueratina-17 (coloración roja), presente en los queratinocitos humanos. El núcleo celular se tiñó con Hoechst 33342 (coloración azul) y los filamentos de actina propios del citoesqueleto de las células se tiñeron con faloidina (coloración amarilla) (**figura 34**).

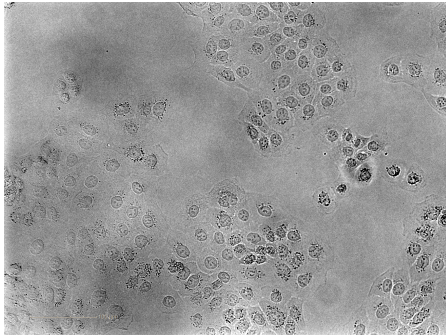
Las observaciones se realizaron en células sin tratamiento y células estimuladas con 250 ng/ml de IL-17A durante 24 horas. Pese a que se observa un ligero incremento de la intensidad de fluorescencia por acción de esta citoquina, no se observaron diferencias significativas en la intensidad total de fluorescencia Alexa Fluor® 647 (**figura 35**). Esta se corresponde con la cantidad de citoqueratina-17, por lo que el tratamiento con IL-17A durante 24 horas no induce significativamente la expresión de esta queratina en las células HaCaT.



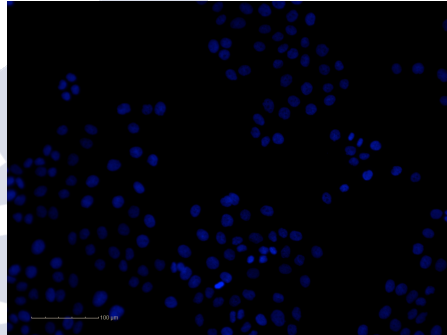
A



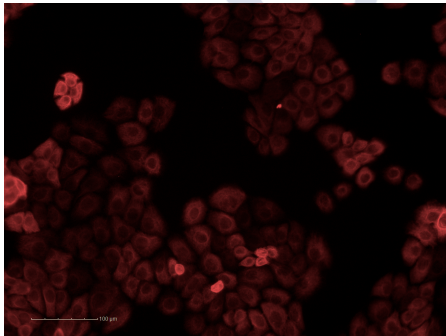
B



C



D



E

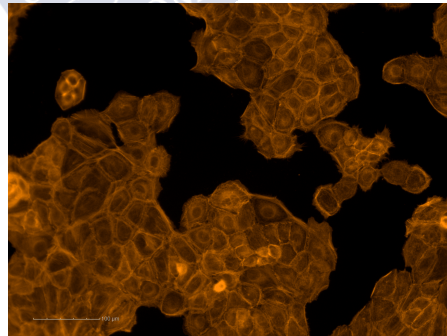


Figura 34. Imágenes de fluorescencia resultado de la tinción de la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. Campo claro (B) y tinciones realizadas con Hoechst 33342 (coloración azul, C), citoqueratina-17 Alexa Fluor® 647 (coloración roja, D) y faloidina Alexa Fluor® 568 (coloración amarilla, E). Se muestra un experimento representativo realizado por sextuplicado.

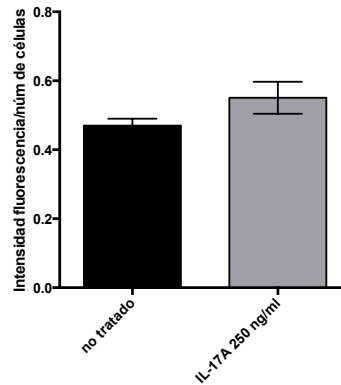


Figura 35. Intensidad de fluorescencia correspondiente a la expresión de citoqueratina-17 en células HaCaT sin tratar y tratadas con 250 ng/ml de IL-17A durante 24 horas. Se representa la media \pm EEM de un experimento representativo realizado por sextuplicado.

4.4. Desarrollo de un ensayo de liberación de quimioquinas proinflamatorias en queratinocitos humanos

Se desarrolló un ensayo de liberación de quimioquinas en respuesta a la estimulación proinflamatoria de IL-17A, junto con $\text{TNF}\alpha$, en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. Se determinaron las quimioquinas IL-8 (también denominada CXCL8) y CCL20 liberadas en respuesta a esta inflamación, ambas relevantes en las patologías autoinmunes mediadas por IL-17A.

Las células estimuladas con concentraciones crecientes de IL-17A (entre 0,156 y 400 ng/ml), IL-17A en presencia de 10 ng/ml de TNF α , o TNF α (entre 0,0625 y 80 ng/ml) durante 24 horas respondieron con un incremento en la liberación de IL-8 y CCL20 en el sobrenadante. De esta manera, se obtuvieron curvas de respuesta a las distintas concentraciones de IL-17A y a TNF α . Esto permitió seleccionar 100 ng/ml de IL-17A en combinación con 10 ng/ml de TNF α como la concentración adecuada para estimular las células y poder identificar una respuesta inhibitoria con ligando farmacológico (**figura 36-37**). En el caso de TNF α , se observó una respuesta adecuada a una concentración de 10 ng/ml.

Con la obtención de estas curvas de respuesta inflamatoria se observa una acción conjunta de ambos estímulos, IL-17A y TNF α , que producen un incremento de la liberación de quimioquinas superior a estas empleadas por separado, especialmente destacable en la secreción de CCL20 (con respecto a IL-8) (**figura 38**). Así, en el caso de CCL20, con el uso de ambas citoquinas se produce un incremento de un 41,44 % con respecto al uso de IL-17A únicamente y uno de un 36,94 % con respecto a TNF α solo. En este sentido, para IL-8, el uso de ambas citoquinas produce un incremento de un 29,42 % con respecto a IL-17A sola y uno de un 16,31 % con respecto a TNF α utilizado solo.

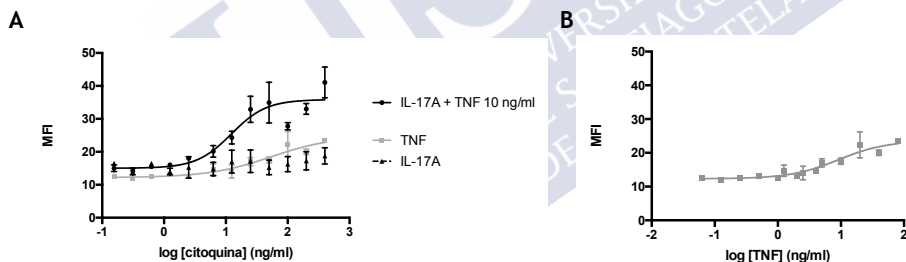


Figura 36. Liberación de CCL20 en respuesta a concentraciones crecientes de IL-17A, IL-17A en presencia de 10 ng/ml de TNF α (A), o concentraciones crecientes de TNF α (B) en la línea celular de queratinocitos HaCaT. Se representa la media \pm EEM de la MFI dos experimentos independientes realizados por duplicado.

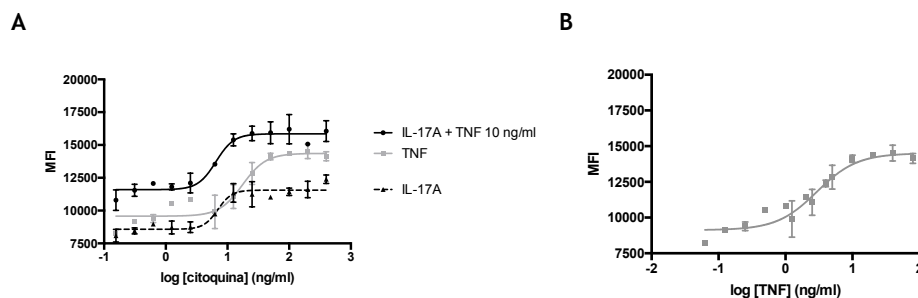


Figura 37. Liberación de IL-8 en respuesta a concentraciones crecientes de IL-17A, IL-17A en presencia de 10 ng/ml de TNFα (A), o concentraciones crecientes de TNFα (B) en la línea celular de queratinocitos HaCaT. Se representa la media \pm EEM de la MFI de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

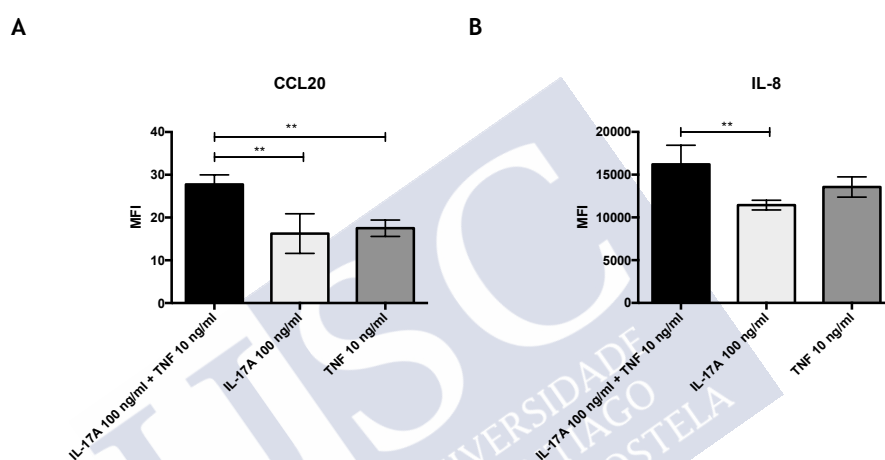


Figura 38. Liberación de CCL20 (A) e IL-8 (B) en respuesta a 100 ng/ml de IL-17A, 100 ng/ml de IL-17A en presencia de 10 ng/ml de TNFα, o 10 ng/ml de TNFα en queratinocitos humanos. Se representa la media \pm EEM de dos experimentos independientes realizados por duplicado. ** $p<0,01$ (ANOVA).

Una vez determinada la concentración adecuada de IL-17A y TNFα para producir una respuesta de CCL20 e IL-8 medible en las células HaCaT se empleó el péptido anti-IL-17A como control de la inhibición de la liberación de IL-8 y CCL20 mediada por IL-17A. Para determinar dicha actividad inhibitoria, se emplearon curvas

concentración-respuesta con un rango de concentraciones entre 15,6 nM y 2000 nM, de forma que se obtuvieron unos valores de IC_{50} de 736 ± 115 nM y 378 ± 125 nM para el bloqueo de la liberación de IL-8 y CCL20, respectivamente. Dicho bloqueo de la respuesta inflamatoria inducida por IL-17A junto con $TNF\alpha$ fue, además, total, como se evidencia en los datos del porcentaje de reducción de dicha actividad inflamatoria (**figura 39**) (**tabla 14**).

Así, se confirmó la capacidad del ensayo para determinar la actividad farmacológica anti-inflamatoria de los ligandos CBG040591 y CBG060392.

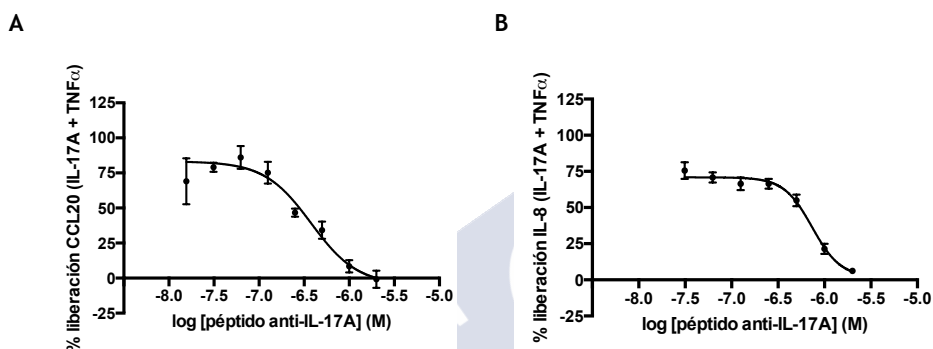


Figura 39. Inhibición de la liberación de CCL20 (A) e IL-8 (B) producida por IL-17A (100 ng/ml) y $TNF\alpha$ (10 ng/ml) en respuesta a concentraciones crecientes del péptido anti-IL-17A en queratinocitos humanos. Se representa la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Tabla 14. Respuesta inhibitoria del péptido anti-IL-17A (IC_{50} y porcentaje de reducción sobre la respuesta máxima de IL-17A y $TNF\alpha$) sobre la liberación de IL-8 y CCL20 en las células HaCaT normalizada a la liberación producida por IL-17A y $TNF\alpha$. Los datos representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

	IC_{50} (nM)	Reducción respuesta máxima (%)
Péptido CCL20	378 ± 125	$1,9 \pm 8,2$
Péptido IL-8	736 ± 115	$-4,9 \pm 11,8$

4.5. Evaluación de la actividad inhibitoria de los ligandos sobre la liberación de CCL20 mediada por IL-17A en queratinocitos humanos

Se determinó la actividad inhibitoria de los compuestos candidatos CBG040591 y CBG060392 generando curvas concentración-respuesta de liberación de CCL20 tras estimular la línea celular con IL-17A a 100 ng/ml y 10 ng/ml de TNF α en presencia de concentraciones crecientes de compuesto, entre 1,56 μ M y 100 μ M.

Ambos compuestos (CBG040591 y CBG060392) inhibieron parcialmente la liberación específica de CCL20 estimulada por la acción de IL-17A en presencia de TNF α con una actividad dependiente de la concentración utilizada (**figura 40**) (**tabla 15**).

La reducción en la respuesta máxima fue de un 25 %, aproximadamente, para ambos ligandos (hasta un 28,0 % o un 16,5 % para CBG040591 y CBG060392, respectivamente) (**figura 40**) (**tabla 15**).

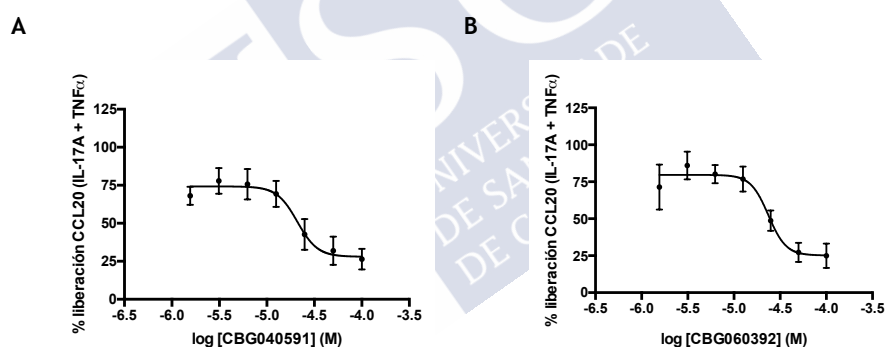


Figura 40. Inhibición de la liberación de CCL20 producida por IL-17A (100 ng/ml) y TNF α (10 ng/ml) en respuesta a concentraciones crecientes de los compuestos CBG040591 (A) y CBG060392 (B) en la línea celular de queratinocitos HaCaT. Se representa la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Tabla 15. Respuesta inhibitoria de los compuestos CBG040591 y CBG060392 (IC_{50} y porcentaje de reducción sobre la respuesta máxima de IL-17A y TNF α) sobre la liberación de CCL20 en las células HaCaT normalizada a la liberación producida por IL-17A y TNF α . Los datos representan la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

	IC_{50} (μ M)	Reducción respuesta máxima (%)
CBG040591	20,9 \pm 12,6	28,0 \pm 6,8
CBG060392	23,6 \pm 11,8	16,5 \pm 12,06

4.6. Evaluación de la actividad inhibitoria de los ligandos sobre la liberación de IL-8 mediada por IL-17A en queratinocitos humanos

Se determinó la actividad inhibitoria de los compuestos candidatos CBG040591 y CBG060392 obteniendo curvas concentración-respuesta de liberación de IL-8 tras estimular la línea celular con IL-17A a 100 ng/ml y 10 ng/ml de TNF α en presencia de concentraciones crecientes de compuesto, entre 1,56 μ M y 100 μ M.

Ambos compuestos inhibieron parcialmente la liberación específica de IL-8 estimulada por la acción de IL-17A en presencia de TNF α con una actividad dependiente de la concentración utilizada (**figura 41**) (**tabla 16**).

La reducción en la liberación de IL-8 fue distinta para cada uno de los ligandos. Así, CBG060392 redujo la respuesta inflamatoria hasta un 25,2 %, mientras que la reducción de la inflamación en el caso de CBG040591 fue de solo un 51,9 % (**figura 41**) (**tabla 16**).

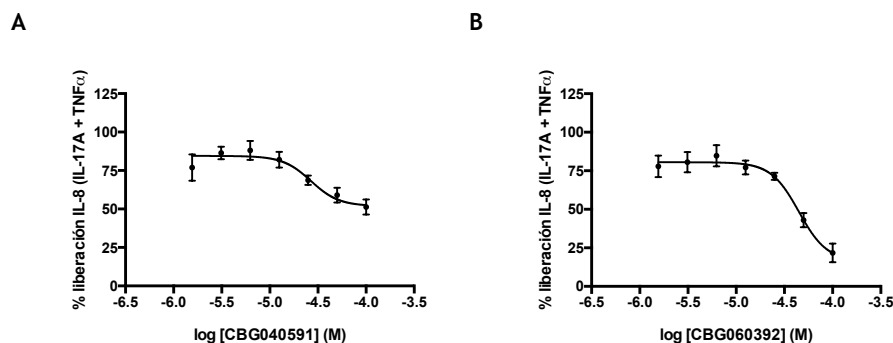


Figura 41. Inhibición de la liberación de IL-8 producida por IL-17A (100 ng/ml) y TNFα (10 ng/ml) en respuesta a concentraciones crecientes de los compuestos CBG040591 (A) y CBG060392 (B) en la línea celular de queratinocitos HaCaT. Se representa la media ± EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Tabla 16. Respuesta inhibitoria de los compuestos CBG040591 y CBG060392 (IC_{50} y porcentaje de reducción sobre la respuesta máxima de IL-17A y TNFα) sobre la liberación de IL-8 en las células HaCaT normalizada a la liberación producida por IL-17A y TNFα. Los datos representan la media ± EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

	IC_{50} (μ M)	Reducción respuesta máxima (%)
CBG040591	26,7 ± 13,1	51,9 ± 6,6
CBG060392	45,3 ± 13,0	25,2 ± 7,0

Estos datos de IL-8, junto con los de CCL20, permiten evidenciar que CBG040591 y CBG060392 bloquean parcialmente la respuesta inflamatoria de IL-17A y TNFα en queratinocitos humanos.

4.7. Evaluación de la selectividad de los ligandos sobre la inhibición de la liberación de IL-8 y CCL20 en queratinocitos humanos

Para evaluar si la respuesta inhibitoria de los compuestos CBG040591 y CBG060392 sobre la liberación de quimioquinas proinflamatorias IL-8 y CCL20 es específica de IL-17A, los queratinocitos humanos se estimularon con $\text{TNF}\alpha$ en ausencia de dicha interleuquina. Previamente se obtuvo una curva concentración-respuesta para la estimulación con $\text{TNF}\alpha$, de forma que se pudo establecer su respuesta máxima en la producción de IL-8 y CCL20 (figuras 36-37).

Se cuantificó la liberación de CCL20 e IL-8 tras estimular la línea celular con 10 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ en presencia de concentraciones de ligandos de 6,25 μM , 25 μM y 100 μM (figura 42 y 43).

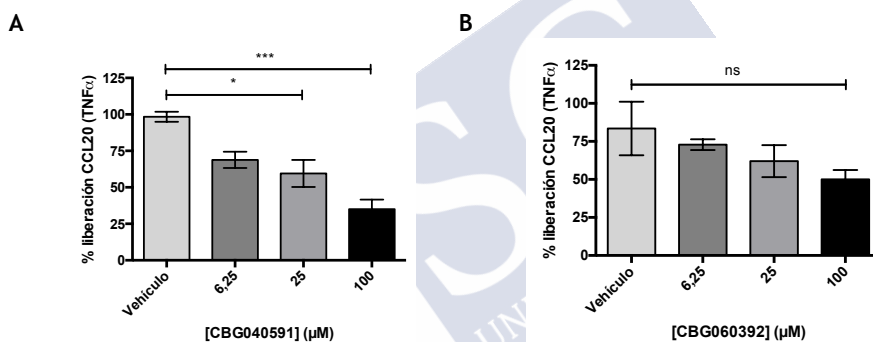


Figura 42. Inhibición de la liberación de CCL20 producida por $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) en respuesta a los compuestos CBG040591 (A) y CBG060392 (B) en la línea celular de queratinocitos HaCaT. Se representa la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA).

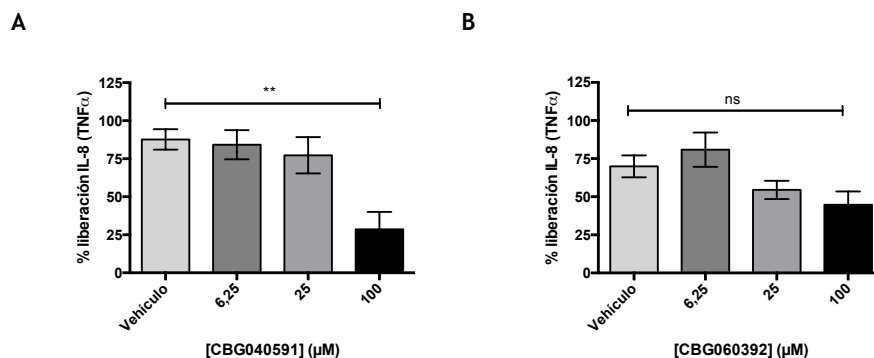


Figura 43. Inhibición de la liberación de IL-8 producida por TNFα (10 ng/ml) en respuesta a los compuestos CBG040591 (**A**) y CBG060392 (**B**) en la línea celular de queratinocitos HaCaT. Se representa la media ± EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado. **p<0,01 (ANOVA).

En el caso del compuesto CBG040591 existe una inhibición estadísticamente significativa de la liberación de CCL20 e IL-8 a concentraciones altas: CCL20 se inhibe a concentraciones superiores a 25 μM; mientras que la inhibición de IL-8 solo ocurre a 100 μM. Por otro lado, el compuesto CBG060392 no tiene actividad inhibitoria sobre la liberación de CCL20 e IL-8 inducidas por TNFα.

De este modo, la liberación de CCL20 e IL-8 originada por TNFα se vio parcialmente bloqueada solamente por la quinazolinona, indicando que esta estructura química podría no ser selectiva a la hora de evitar las respuestas inflamatorias generadas por IL-17A relacionada con la inflamación crónica en la psoriasis. Por el contrario, la ausencia de bloqueo en las quimioquinas liberadas por TNFα en el caso de la pirrolidina-2,5-diona CBG060392 indican que es más selectiva de IL-17A, de modo que precisa la presencia de esta citoquina para ejercer su actividad inhibitoria.

5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LOS LIGANDOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE QUIMIOQUINAS PROINFLAMATORIAS

5.1. Desarrollo de un ensayo de expresión de quimioquinas inflamatorias en queratinocitos humanos

Se puso a punto un ensayo de expresión de quimioquinas proinflamatorias inducidas por la estimulación de queratinocitos humanos con IL-17A. Las quimioquinas cuya expresión se midió como respuesta a dicha inflamación fueron CCL20 y CXCL8, cuya liberación había sido cuantificada con anterioridad mediante un inmunoensayo.

Las células HaCaT se estimularon con 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α ; 100 ng/ml de IL-17A; o 10 ng/ml de TNF α durante 24 horas. De esta manera, se observó que la inducción de la expresión de *CCL20* y *CXCL8* es dependiente de las citoquinas empleadas para producir el estímulo inflamatorio en los queratinocitos HaCaT. De forma análoga al caso de la liberación de quimioquinas, la combinación de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α se seleccionó para identificar ligandos que pudieran inhibir dicha inflamación (**figura 44**).

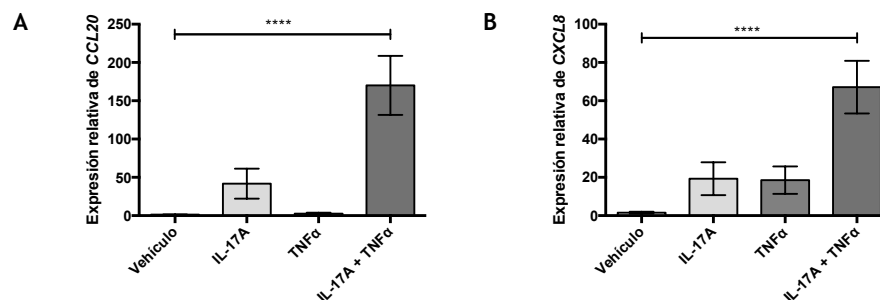


Figura 44. Expresión de *CCL20* (A) y *CXCL8* (B) en respuesta a 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNFα; 100 ng/ml de IL-17A o 10 ng/ml de TNFα en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. El eje es distinto para cada citoquina. Se representa la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (ANOVA).

El péptido anti-IL-17A se empleó como control de inhibición de la expresión de *CCL20* y *CXCL8* mediada por 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNFα. Se observó una disminución significativa de la expresión de ambas citoquinas tras su uso a 1 μ M (**figura 45**). Así, se confirmó la capacidad del ensayo para caracterizar los compuestos candidatos CBG040591 y CBG060392.

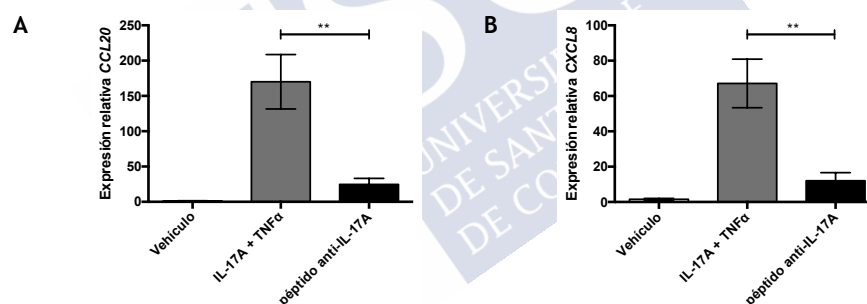


Figura 45. Expresión de *CCL20* (A) y *CXCL8* (B) inducida por 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNFα e inhibida por el péptido anti-IL-17A en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. El eje es distinto para cada citoquina. Se representa la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (ANOVA).

5.2. Evaluación de la actividad inhibitoria de los ligandos sobre la expresión de *CCL20* y *CXCL8* mediada por IL-17A en queratinocitos humanos

Se evaluó la actividad inhibitoria de CBG040591 y CBG060392 sobre la expresión de *CCL20* y *CXCL8* en queratinocitos humanos. Para dicha evaluación, se obtuvieron los valores de expresión de *CCL20* y *CXCL8* tras estimular la línea celular con 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α en presencia de una concentración de compuesto de 100 μ M (**figura 46**).

El ligando CBG060392 mostró una inhibición significativa de la expresión de *CCL20* y de *CXCL8* en las células HaCaT estimuladas por la acción de IL-17A en presencia de TNF α . En el caso de CBG040591, esta molécula no mostró una inhibición significativa de ninguna de las quimioquinas que se liberan en la respuesta inflamatoria de IL-17 y TNF α en queratinocitos humanos.

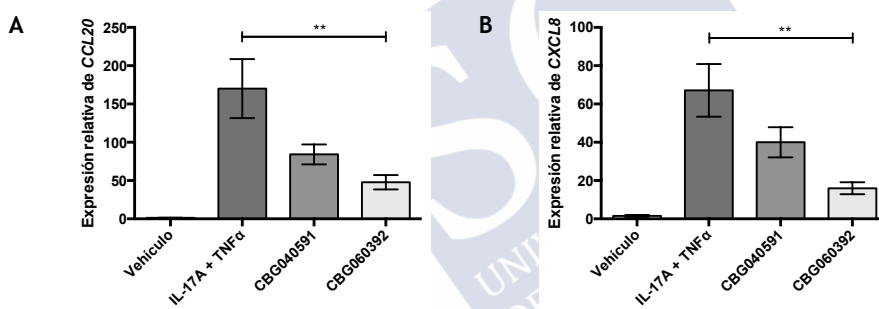


Figura 46. Expresión de *CCL20* (A) y *CXCL8* (B) inducida por 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α e inhibida por los compuestos CBG040591 y CBG060392 en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. El eje es distinto para cada citoquina. Se representa la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$ (ANOVA).

Por lo tanto, la represión de la transcripción de los genes correspondientes a *CCL20* y *CXCL8* es coherente con el perfil inhibitorio de CBG040591 y CBG060392 observado en los ensayos de

liberación de quimioquinas. Así, la inhibición de su liberación o su expresión está parcialmente bloqueada, en mayor medida por CBG060392, de forma que se evita de forma parcial la respuesta inflamatoria producida por la interleuquina 17A.

6. EFECTO DE LOS LIGANDOS SOBRE LA SEÑALIZACIÓN INFLAMATORIA DE IL-17 EN QUERATINOCITOS HUMANOS

6.1. Evaluación de la actividad de los ligandos sobre la señalización de NF- κ B p65 mediada por IL-17A

Se evaluó el efecto de los ligandos CBG040591 y CBG060392 sobre la señalización proinflamatoria de IL-17A mediante la determinación de la expresión de NF- κ B p65 y NF- κ B p65 fosforilada. Para ello, los queratinocitos HaCaT se estimularon con 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α en presencia o ausencia de CBG040591 o CBG060392 a una concentración de 100 μ M.

El nivel de expresión de p65, tanto en las células no estimuladas con IL-17A y TNF α como en las que sí lo estaban, fue similar. Ocurrió lo mismo en presencia de CBG040591 y CBG060392 (**figura 47**).

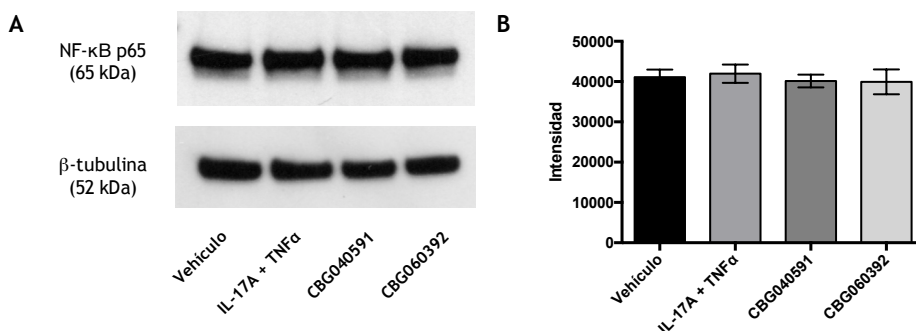


Figura 47. Western blot de NF-κB p65 de las células HaCaT tratadas con 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNFα en ausencia o presencia de CBG040591 y CBG060392 a 100 μM. (A) Se muestra una imagen representativa de seis experimentos independientes. (B) Cuantificación de la media de la intensidad de NF-κB p65 ± EEM de al menos cinco experimentos independientes.

Con la estimulación proinflamatoria de IL-17A y TNFα se produjo un incremento significativo de la fosforilación de NF-κB p65 (**figura 48**). Dicho incremento de la fosforilación de NF-κB p65 no se atenuó por la presencia de CBG040591 ni de CBG060392, que no mostraron una inhibición significativa de la señalización de IL-17A y TNFα sobre NF-κB tras una estimulación de 24 horas (**figura 48**).

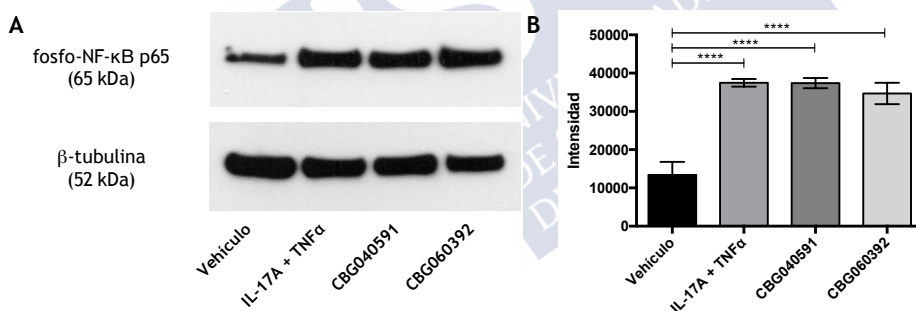


Figura 48. Western blot de fosfo-NF-κB p65 (Ser536) de las células HaCaT tratadas con 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNFα en ausencia o presencia de CBG040591 y CBG060392 a 100 μM. (A) Se muestra una imagen representativa de seis experimentos independientes. (B) Cuantificación de la media de la intensidad de fosfo-NF-κB p65 (Ser536) ± EEM de al menos cinco experimentos independientes. ***p<0,001; ****p<0,001 (ANOVA).

6.2. Evaluación de la actividad de los ligandos sobre la señalización de I κ B α mediada por IL-17A

Se evaluó el efecto de los ligandos CBG040591 y CBG060392 determinando la expresión de I κ B α y I κ B α fosforilada tras la estimulación de los queratinocitos HaCaT con 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α en presencia o ausencia de CBG040591 o CBG060392.

Los niveles de expresión de I κ B α fueron similares tanto en las células no estimuladas con IL-17A y TNF α como en las que sí lo estaban. Dichos niveles de expresión se mantuvieron en las células tratadas con CBG040591 o CBG060392 (**figura 49**).

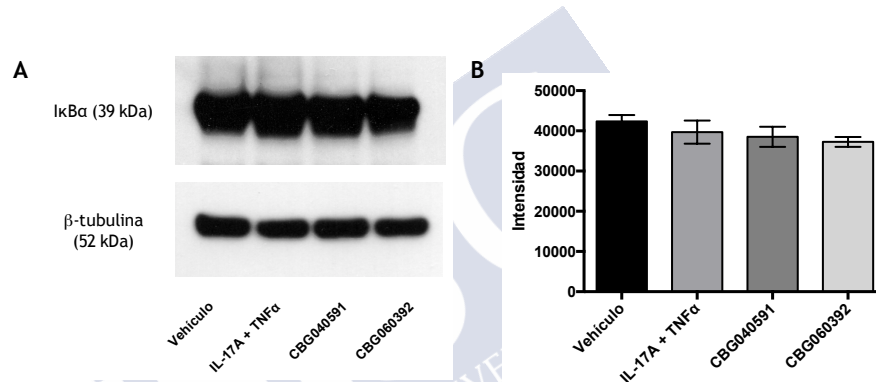


Figura 49. Western blot de I κ B α de las células HaCaT tratadas con 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α en ausencia o presencia de CBG040591 y CBG060392 a 100 μ M. (A) Se muestra una imagen representativa de cinco experimentos independientes. (B) Cuantificación de la media de la intensidad de I κ B α \pm EEM de al menos cinco experimentos independientes.

La estimulación proinflamatoria de IL-17A y TNF α produjo un incremento significativo de la fosforilación de I κ B α (**figura 50**). Dicho incremento de la fosforilación de I κ B α se mantuvo en presencia de CBG040591. Sin embargo, en el caso de CBG060392, se

observó una disminución significativa de los niveles de fosforilación de I κ B α . Esto indica que CBG060392 inhibe parcialmente la señalización proinflamatoria de IL-17A y TNF α a nivel de I κ B α , tras un tratamiento de 24 horas (**figura 50**). Dicho efecto inhibitorio puede resultar en el bloqueo parcial de la cascada de señalización inflamatoria de NF- κ B.

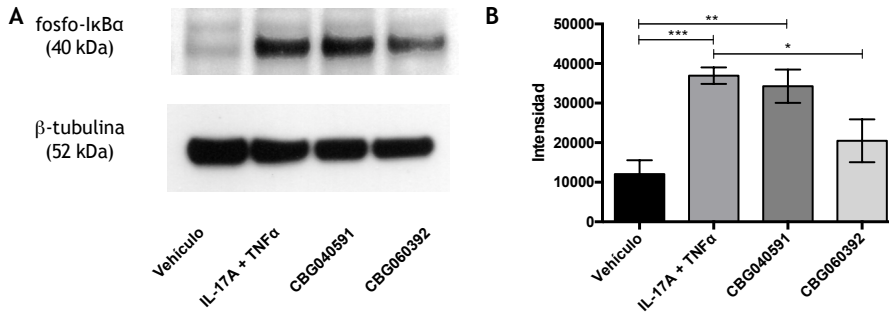


Figura 50. Western blot de fosfo-I κ B α (Ser32) de las células HaCaT tratadas con 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α en ausencia o presencia de CBG040591 y CBG060392 a 100 μ M. (A) Se muestra una imagen representativa de cinco experimentos independientes. (B) Cuantificación de la media de la intensidad de fosfo-I κ B α \pm EEM de al menos cinco experimentos independientes. * p <0,05; ** p <0,01 (ANOVA).

6.3. Desarrollo de un ensayo de expresión de *CEBPB* y *ZC3H12A* en queratinocitos humanos

Se desarrolló un ensayo de expresión de proteínas propias de la cascada inflamatoria de IL-17A (C/EBP β y Regnasa-1 o ZC3H12A) en queratinocitos humanos. Las células HaCaT se estimularon con 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α ; 100 ng/ml de IL-17A; o 10 ng/ml de TNF α durante 24 horas.

De esta manera, se observó que la inducción de la expresión de *CEBPB* y *ZC3H12A* es dependiente de las citoquinas empleadas en producir el estímulo inflamatorio en HaCaT. De igual modo que ocurría en el estudio de la expresión de *CCL20* y *CXCL8* inducida por

IL-17A, la combinación de IL-17A y 10 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ se seleccionó para identificar ligandos que pudieran inhibir dicha inflamación (**figura 51**).

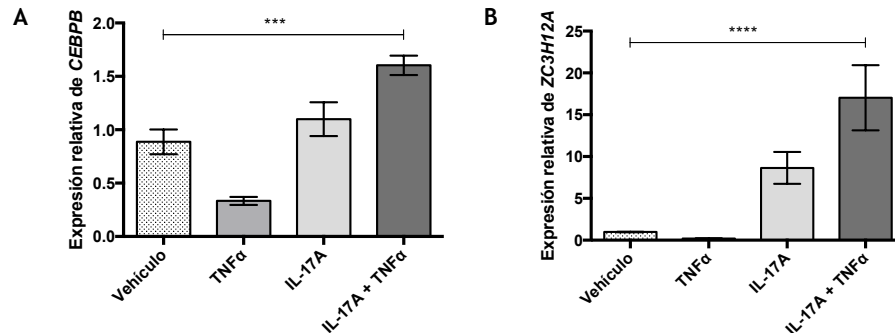


Figura 51. Expresión de *CEBPB* (A) y *ZC3H12A* (B) en respuesta a 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$; 100 ng/ml de IL-17A o 10 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. El eje es distinto para cada proteína. Se representa la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (ANOVA).

El péptido anti-IL-17A se empleó como inhibidor de la expresión de *CEBPB* y *ZC3H12A* mediada por 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$, debido a que inhibe la interacción efectiva entre IL-17A y su receptor. Se observó una disminución significativa de la expresión de ambas proteínas tras su uso a 1 μM (**figura 52**), lo que permite su utilización como referencia para comprobar si los ligandos CBG040591 y CBG060392 ejercen también un efecto inhibidor.

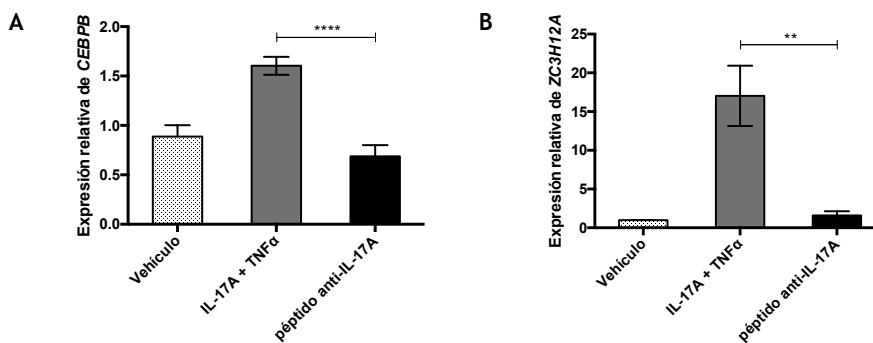


Figura 52. Expresión de *CEBPB* (A) y *ZC3H12A* (B) inducida por 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α e inhibida por el péptido anti-IL-17A en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. El eje es distinto para cada proteína. Se representa la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (ANOVA).

6.4. Evaluación de la actividad de los ligandos sobre la señalización de C/EBP β mediada por IL-17A

Se evaluó la actividad inhibitoria de CBG040591 y CBG060392 sobre la expresión de *CEBPB* en queratinocitos humanos. Para dicha evaluación, se obtuvieron los valores de expresión de *CEBPB* tras estimular la línea celular HaCaT con 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α en presencia de una concentración de compuesto de 100 μ M. (**figura 53**).

Ambos compuestos mostraron una inhibición significativa de la expresión de *CEBPB* en las células HaCaT estimuladas por IL-17A en presencia de TNF α . Esto es indicativo de que evitan la transducción de la cascada de señalización del receptor de IL-17A.

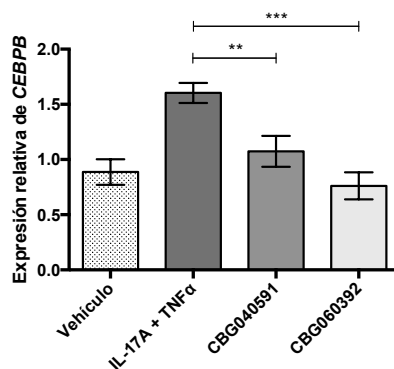


Figura 53. Expresión de *CEBPB* inducida por 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α e inhibida por los compuestos CBG040591 y CBG060392 en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. Se representa la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (ANOVA).

Por lo tanto, la represión de la transcripción de *CEBPB* es coherente con el perfil inhibitorio de CBG040591 y CBG060392 observado en otros puntos de la transducción de la señal de IL-17A: la reducción de la expresión de los genes diana *CCL20* y *CXCL8* y su consiguiente liberación como quimioquinas al sobrenadante. Así, los ligandos evitan de forma parcial la respuesta inflamatoria producida por la interleuquina 17A.

6.5. Evaluación de la actividad de los ligandos sobre la señalización de Regnasa-1 mediada por IL-17A

Se evaluó la actividad inhibitoria de CBG040591 y CBG060392 sobre la expresión de *ZC3H12A* en queratinocitos humanos. Para dicha evaluación, se obtuvieron los valores de expresión de *ZC3H12A* tras estimular la línea celular con 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α en presencia de una concentración de compuesto de 100 μ M (figura 54).

El compuesto CBG060392 mostró una inhibición significativa de la expresión de *ZC3H12A* en las células HaCaT estimuladas por la acción de IL-17A en presencia de TNF α . Por el contrario, la reducción de la expresión de *ZC3H12A* por acción de CBG040591 no fue significativa.

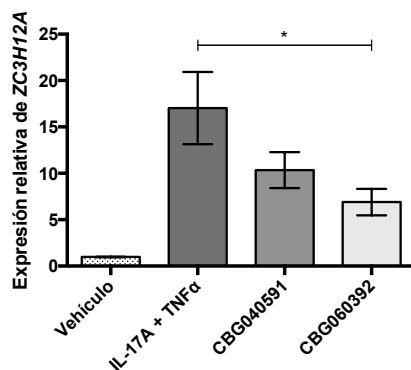


Figura 54. Expresión de *ZC3H12A* inducida por 100 ng/ml de IL-17A y 10 ng/ml de TNF α e inhibida por los compuestos CBG040591 y CBG060392 en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. Se representa la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$ (ANOVA).

Por lo tanto, la inhibición de la transcripción *ZC3H12A* es coherente con el bloqueo parcial de la transducción de la señal de IL-17RA por CBG040591 y CBG060392: tanto en la señalización por C/EBP β como en el caso de la vía de NF- κ B. Así, la inhibición de la expresión de *ZC3H12A* está parcialmente bloqueada, en mayor medida por CBG060392, de forma que se evita de forma parcial la respuesta inflamatoria producida por la interleuquina 17A.



DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

En este trabajo se ha demostrado que es posible identificar moléculas de bajo peso molecular con actividad inhibitoria de IL-17A en un modelo orientado hacia la psoriasis. Para ello, se ha desarrollado una metodología de descubrimiento temprano de fármacos.

La interleuquina 17A es una citoquina proinflamatoria que tiene un papel crucial en la patogénesis de varias enfermedades autoinmunes. Esto se ha podido validar y demostrar con el éxito de los anticuerpos neutralizantes dirigidos a IL-17A (como secukinumab e ixekizumab) y el receptor IL-17RA (brodalumab) en el tratamiento de la psoriasis y la artritis psoriásica (38,98,218). Además, en el caso de secukinumab, se ha evaluado su eficacia, seguridad y permanencia en el organismo a largo plazo con un resultado favorable (175). El desequilibrio entre las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias que se produce en la piel de los pacientes con psoriasis y que ocasiona las manifestaciones clínicas de la enfermedad (como las lesiones cutáneas en forma de placas eritematoescamosas simétricas, la inflamación o el dolor) se modula farmacológicamente con estos anticuerpos y se produce una mejoría clínica al inhibir la IL-17.

Todavía existen limitaciones en el uso de medicamentos biológicos, lo cual incluye a los anticuerpos anti-IL-17. Entre dichas limitaciones se encuentran su elevado coste de fabricación debido a su complejidad, así como la pérdida de permanencia del fármaco en el organismo en el caso de los tratamientos crónicos. Sin embargo, la limitación más relevante de los medicamentos biológicos es la necesidad de utilizar una vía de administración parenteral, ya que los anticuerpos carecen de biodisponibilidad oral (124,145,147,148). La

vía oral es la preferida por los pacientes, de forma que su uso puede mejorar la permanencia y la adherencia, así como la satisfacción de los pacientes con sus tratamientos crónicos (219).

Por ello, en este trabajo se ha considerado de interés científico y tecnológico evaluar la viabilidad de bloquear la interacción entre IL-17A e IL-17RA con moléculas pequeñas y de forma específica. De esta manera, la señalización proinflamatoria que deriva de la unión de esta citoquina a su receptor se podría inhibir con ligandos químicos de un modo similar al de los biológicos aprobados como medicamentos. En este sentido, se han identificado macrociclos sintéticos que son antagonistas de IL-17A. Para ello se han empleado estrategias como el cribado de quimiotecas codificadas por ADN (DEL), el diseño racional y la co-cristalización (173,174,220). Junto con los péptidos bloqueantes de IL-17, y pese a que no hemos podido identificar que ninguno de estos macrociclos haya progresado a fases clínicas, estos compuestos han sido un punto de partida para estudiar los sitios de unión del dímero de IL-17A y su receptor IL-17RA.

Por otra parte, pese a que se ha avanzado en el desarrollo de moléculas pequeñas que alteran las interacciones proteína-proteína, este tipo de uniones sigue siendo un reto desde el punto de vista tecnológico y desde el punto de vista del desarrollo de fármacos. No existe una metodología específica para identificar moléculas pequeñas que afecten a las interacciones proteína-proteína entre IL-17A e IL-17RA. Y no se trata de un caso único para IL-17, sino también para tratamientos potenciales que se diseñen para bloquear otras citoquinas proinflamatorias relevantes en clínica, así como para otras dianas emergentes.

Por ello, esta tesis doctoral se planteó sobre las bases de que es necesario desarrollar nuevas metodologías que permitan identificar nuevos ligandos de IL-17A/IL-17RA con actividad antiinflamatoria que puedan ayudar a abordar las necesidades terapéuticas no cubiertas en enfermedades como la psoriasis. En este trabajo se ha descrito el desarrollo de una combinación de metodologías de unión

in silico, biofísicas y basadas en modelos celulares para identificar y validar moléculas pequeñas dirigidas a la vía de señalización de IL-17A/IL-17RA.

Tanto los enfoques basados en técnicas computacionales como aquellos basados en técnicas biofísicas se emplean de forma generalizada en la identificación de *hits* en proyectos de descubrimiento temprano de fármacos (156,161,221–223). De hecho, junto con la biología estructural, se utilizan frecuentemente para evaluar la capacidad de una diana proteica (especialmente si se trata de una interacción proteína-proteína) para unir moléculas pequeñas que modifiquen su actividad, así como para identificar sus sitios de unión y *hotspots* (grupo de residuos clave en la unión entre proteínas). Dichos enfoques también se utilizan para descubrir otro tipo de herramientas farmacológicas, como pueden ser los péptidos pequeños (156,221,224).

La superficie de interacción entre la interleuquina IL-17A y su receptor es extensa y plana, de forma que ocupa un área de aproximadamente 2200 Å² (23). Esta superficie de interacción proteína-proteína es difícil de alterar con ligandos de bajo peso molecular. Probablemente esta es la principal razón por la que todavía no hay moléculas pequeñas en desarrollo clínico a pesar de que los anticuerpos anti-IL-17A o anti-IL-17RA tienen eficacia terapéutica para neutralizar la actividad proinflamatoria de IL-17 en la psoriasis (152,156,172).

Con el objetivo construir una **quimioteca focalizada** para IL-17A/IL-17RA se desarrolló un **cribado virtual**, con la colaboración con el Dr. Christian Munteanu. Para ello se empleó la quimioteca del grupo BioFarma, que posee un grado de diversidad estructural y biológica propicio para identificar moléculas novedosas. Esto se debe a que las 60 000 moléculas que forman parte de esta quimioteca se seleccionaron de forma racional para cumplir los estándares de las iniciativas de redes de cribado amplias, como las plataformas de cribado de alta capacidad de EU-OPENSREEN (181).

Así, para realizar el cribado virtual para las dianas IL-17A/IL-17RA se empleó una técnica de *docking* de uso muy extendido, AutoDock, que permite predecir la unión ligandos a la estructura proteica, la diana (182). Con este tipo de herramientas se pueden ordenar las moléculas según su puntuación, esto es, según la afinidad de su unión a la proteína diana (155).

Pese a que se trata de una herramienta muy útil por su balance coste/eficacia, especialmente como procedimiento inicial para la identificación de *hits*, el *docking* no está exento de limitaciones. Entre ellas se encuentran la simplificación de la interacción al no tener en cuenta las moléculas de agua; o la falta de dinamismo de la estructura proteica, que se considera rígida, frente a la del ligando, cuya flexibilidad sí se incluye en el proceso de *docking*. Además, en el caso concreto de las interacciones proteína-proteína, encontrar moléculas que se acoplen a estas superficies es más difícil que en el caso de cavidades enzimáticas o en los lugares de unión conocidos para ligandos endógenos (155,225).

El estudio de *docking* de este trabajo permitió construir una quimioteca focalizada de 67 compuestos. Una vez identificados como potenciales ligandos de la interacción entre IL-17A e IL-17RA, se **cribaron** los mejores candidatos y se **caracterizó** la unión de estas moléculas al receptor IL-17RA mediante dos **ensayos biofísicos label-free**: redistribución dinámica de masas (DMR) y resonancia de plasmones superficiales (SPR).

La principal ventaja de este tipo de ensayos biofísicos *label-free* es que no es necesario marcar ningún componente del ensayo, de modo que se evitan interferencias y se facilita el proceso de desarrollo de ensayo (155,184,226,227). En los ensayos biofísicos, las dianas pueden estudiarse en su estado nativo y de forma no invasiva. De forma general, se inmoviliza uno de los componentes de la unión y se cuantifica a tiempo real la respuesta biológica cuando se añade el segundo. Es el biosensor el que transforma dicha respuesta biológica en una señal medible (184,227). La SPR es la técnica de *label-free* con biosensor más utilizada y desarrollada, frente a la

DMR. Esta tecnología presenta una limitación referida a la incertidumbre que puede generar la interpretación de los datos. Por ello, debe complementarse con otras técnicas para caracterizar y validar adecuadamente las moléculas activas que se obtienen a partir de este ensayo (155,184,226,227).

En este trabajo de tesis doctoral, concretamente para el caso del ensayo DMR, esta técnica se empleó en el formato de ensayo bioquímico, donde se utilizan proteínas y sus ligandos en solución. Frente al formato celular, en el cual se inmovilizan células vivas al biosensor, las señales detectadas por la unión de moléculas pequeñas son más fáciles de interpretar, aunque de menor magnitud. El mencionado formato bioquímico ha demostrado recientemente su utilidad para definir las características de unión de péptidos biológicamente activos a proteínas de interés biomédico como la proteína de señalización Crk-like y la chaperona HSPA8 (228,229). Se trata de dos de los pocos ejemplos de aplicación de DMR basado en proteínas al proceso de descubrimiento de fármacos.

Para desarrollar el ensayo de DMR se evaluaron los parámetros clave para que la unión ligandos-proteína resultara cuantitativa: inmovilización, pH y respuesta de unión a IL-17A. En primer lugar, se inmovilizó el dominio extracelular del receptor IL-17RA. Se optimizó el pH del tampón de inmovilización de modo que permitiese que esta fuera la mejor posible, sin desnaturalizar la proteína. Para ello, se tuvo en cuenta el punto isoeléctrico teórico del dominio extracelular de IL-17RA. Normalmente, un tampón de inmovilización con un pH de una o dos unidades por debajo del punto isoeléctrico de la proteína asegura que los grupos carboxilo de la placa EnSpire-LFB® cargados negativamente capturen la proteína adecuadamente (184). Además, el tampón de inmovilización debe tener poca fuerza iónica y no puede contener aminos primarios que interfieran con el proceso de inmovilización (como Tris) (184). Debido a esto, se empleó un tampón acetato de sodio 20 mM.

Una vez inmovilizado el receptor se confirmó la unión de su ligando endógeno, IL-17A, que siguió una respuesta dependiente de

la concentración. Esto es indicativo, además, de una eficacia de inmovilización de IL-17RA adecuada, ya que permite generar una respuesta de unión al añadir distintas concentraciones de IL-17A. La constante de disociación (K_D) obtenida para la unión de IL-17A a IL-17RA ECD fue de $0,91 \pm 0,21 \mu\text{M}$ a los 60 minutos. Estos valores son de un rango muy superior a los descritos por la bibliografía, en los que se describe una K_D entre 0,7 y 3,7 nM para la unión de la citoquina al receptor (22,23,230). La diferencia observada podría deberse principalmente a que la proteína IL-17A se ha obtenido mediante un preparado interno, y podría no poseer los requisitos de pureza y conformacionales comerciales, por lo que su concentración estimada es probablemente inexacta. Por otro lado, los valores descritos en la literatura científica se han obtenido a partir de ensayos con la tecnología de SPR, y no mediante redistribución dinámica de masas, lo que puede suponer un pequeño grado de variabilidad.

Pese a que el uso de la proteína IL-17A podría no ser un control positivo ideal, dado que el objetivo del estudio es identificar moléculas pequeñas, puede considerarse un control positivo robusto para esta tecnología. La cuantificación de su unión a IL-17RA con una respuesta dependiente de la concentración permitió asegurar que el ensayo de DMR desarrollado es eficiente para identificar ligandos.

De esta manera, los 67 compuestos de la quimioteca focalizada obtenidos tras el estudio de *docking* se priorizaron en el ensayo de DMR desarrollado con anterioridad. Para este ensayo se estudiaron una serie de parámetros estadísticos que pueden ayudar a determinar la idoneidad de un cribado de alto rendimiento pese a que, en este caso, solamente se ha llevado a cabo un cribado de 67 compuestos. Un ensayo ideal tendría unas tasas bajas tanto de falsos positivos como de falsos negativos (189,190).

El factor Z' es el parámetro más indicativo de la calidad de un ensayo de cribado. En nuestro ensayo de DMR para IL-17RA, su valor fue de 0,47, por lo que se podría considerar un test técnicamente

aceptable. Pese a que un ensayo excelente tendría un valor de Z' entre 0,5 y 1, uno aceptable se encontraría con un Z' entre 0 y 0,5 (188,189). En cualquier caso, es necesario tener en cuenta que no es preciso establecer un criterio estricto en este experimento de DMR, dado que no es un cribado de un gran número de moléculas, sino que se ha utilizado una quimioteca focalizada para la interacción entre IL-17A e IL-17RA.

Los coeficientes de variación (CV) de IL-17A (control positivo) (19,2 %) y del tampón de ensayo (control negativo) (19,8 %) se acercaron al límite de la variabilidad aceptable, que debe ser menor o igual al 20 % (189,191). Sin embargo, se consideraron admisibles tras evaluar la relación entre la señal específica y la señal de fondo, es decir, la ventana del ensayo. Con respecto a dicha ventana, la señal de IL-17A en relación al tampón de ensayo fue 5 veces superior, lo cual se considera un muy buen ratio.

Por lo tanto, la puesta a punto del ensayo de redistribución dinámica de masas fue adecuada para identificar ligandos del dominio extracelular de IL-17RA.

Una vez optimizado el ensayo de DMR del presente trabajo se instauró un criterio para decidir qué compuestos deberían ser *hits*. Así pues, se estableció un umbral en la media de los valores de los 67 compuestos a los que se sumaron dos desviaciones estándar de esta media. La decisión convencional es asegurar un porcentaje bajo de falsos positivos, lo que se consigue al establecer un corte en las tres desviaciones estándar de la media de las muestras. Pese a ello, en este caso se decidieron emplear dos desviaciones estándar, dado que existe una preselección de compuestos (son solamente 67), los cuales se considerarían positivos (es decir, ligandos de IL-17RA) con mayor probabilidad que si se realizase una campaña de cribado de miles de compuestos. Por lo tanto, el incremento del riesgo de encontrar falsos positivos se consideró aceptable y, al mismo tiempo, disminuyó la posibilidad de obtener falsos negativos. Con este umbral de dos desviaciones estándar sumadas a la media de los 67

compuestos, se pudieron seleccionar dos *hits*: CBG040591 y CBG060392.

Tras realizar el ensayo de DMR se observó que 28 compuestos de los 67 seleccionados en la quimioteca focalizada (el 41,8 % del total de moléculas) superó el 25 % de unión con respecto a la de IL-17A, y solamente dos superaron el 50 %.

Así pues, tras el desarrollo del ensayo de redistribución dinámica de masas para el dominio extracelular de IL-17RA y del cribado de 67 de la quimioteca focalizada, se identificaron dos *hits*. CBG040591 y CBG060392 se caracterizaron mediante curvas de concentración-respuesta en el mismo ensayo de DMR para IL-17RA ECD que el desarrollado para el cribado. Tanto CBG040591 como CBG060392 mostraron cierto grado de unión inespecífica a concentraciones micromolares altas, lo que implica que sus constantes de disociación (K_D) podrían estar determinadas con un cierto grado inexactitud en este ensayo.

De forma análoga al desarrollo de un método de redistribución dinámica de masas para la identificación de ligandos de IL-17RA ECD, se utilizó un ensayo de SPR con condiciones equivalentes a las del DMR. Así pues, la inmovilización del receptor se produjo también mediante acoplamiento de grupos amino, y se utilizó un tampón de inmovilización equivalente: acetato de sodio 10 mM a un pH de 5,5. De manera similar al ensayo de DMR, con la técnica de SPR también se registró la unión de los compuestos CBG040591 y CBG060392 a IL-17RA ECD a tiempo real, cuya cinética de unión se representa mediante sensorgramas.

Así, se pudo evaluar la afinidad de la unión de CBG040591 y CBG060392 al receptor y, de forma consistente con la técnica de DMR, en ambos compuestos se observó una unión específica, junto con una inespecífica a concentraciones altas de compuesto. La afinidad estimada de la unión de ambas moléculas a IL-17RA fue equivalente a la obtenida con el ensayo de DMR, con unas K_D de 34,6 μ M (SPR) frente a 40,4 μ M (DMR) para CBG040591; y unas K_D de 22,6 μ M (SPR) frente a 19,4 μ M (DMR) para CBG060392. De esta

manera, tanto CBG040591 como CBG060392 se identificaron y confirmaron como ligandos de baja potencia del dominio extracelular de IL-17RA.

Ambas moléculas poseen estructuras que no han sido descritas previamente como biológicamente activas. Sus esqueletos químicos son el de una quinazolinona y una pirrolidina-2,5-diona, respectivamente. Estas estructuras son significativas desde el punto de vista biológico y farmacológico, ya que un número importante de fármacos sintéticos tienen heterociclos similares. Es el caso de los inhibidores de proteína quinasas, cuya estructura química mínima está compuesto por una quinazolina (como gefitinib, lapatinib, erlotinib y afatinib); y de los anticonvulsivantes, que contienen una pirrolidina (levetiracetam, brivaracetam, etosuximida y metosuximida).

Pese a que CBG040591 y CBG060392 no comparten el mismo núcleo de la estructura química, en el modelo de *docking* de este trabajo se ha demostrado que interaccionan en las mismas áreas del complejo proteico IL-17A/IL-17RA. Ambas moléculas comparten un anillo aromático común, que presenta dos (CBG060392) y tres (CBG040591) grupos hidroxilo. De hecho, ambos anillos fenólicos están orientados hacia los aminoácidos arginina 101, glicina 140, isoleucina 137 y prolina 136. Por lo tanto, las interacciones polifenólicas pueden basarse en la formación de puentes de hidrógeno fuertes. En el caso de CBG060392 se pueden formar puentes de hidrógeno con la lisina 135, que contiene un grupo amida en su esqueleto, y con uno de los grupos carbonilo de la pirrolidina-2,5-diona. Por otro lado, el esqueleto de CBG040591 es más rígido químicamente que CBG060392: el biciclo de la quinazolinona es un anillo doble y plano de un sistema conjugado, mientras que CBG060392 contiene fragmentos químicos conectados mediante puentes rotativos. Esto puede explicar una ligera mejora en su adaptabilidad al bolsillo de unión, así como una ligera mejor afinidad por el complejo IL-17A/IL-17RA.

La interacción entre IL-17A e IL-17RA involucra a epítomos con estructuras terciarias, lo que dificulta su interacción con ligandos de bajo peso molecular (23,170). No obstante, como en todas las interacciones proteína-proteína, existen unas subregiones de dicha amplia superficie de unión más involucradas en la misma. En el caso de IL-17A destacan especialmente dos. La primera de ellas (región I), situada en el extremo N-terminal de la proteína, es una zona flexible, una hélice alfa que involucra especialmente a los residuos 60-62, 99, 101 y 110. Entre los 10 aminoácidos de IL-17A/IL-17RA que comparten CBG040591 y CBG060392 en la interacción con el complejo proteico, se encuentra la arginina 101, uno de los *hotspots* de IL-17A. También la prolina 59, que junto con la arginina 101, interacciona con el péptido lineal anti-IL-17A descrito por S. Liu *et al.* (2016).

De esta manera, el área de unión para CBG040591 y CBG060392 está circunscrita específicamente a la interacción de uno de los monómeros de IL-17A y al dominio extracelular de IL-17RA, lo que indica que ambos ligandos pueden ser capaces de alterar esta interacción proteína-proteína. De hecho, las interacciones en los puentes de hidrógeno y en los 10 aminoácidos son comunes a la unión de ambas moléculas al complejo. Así, se podrían considerar aminoácidos clave para las interacciones ligando-proteína y, en consecuencia, dianas para el diseño racional y la optimización de moléculas dirigidas al bloqueo de esta vía de señalización con una finalidad terapéutica.

Algunas de las limitaciones para el potencial desarrollo de CBG040591 y CBG060392 como futuros fármacos están relacionadas con su estructura y su actividad respecto a su unión al complejo IL-17A/IL-17RA. Tras el descubrimiento de *hits*, estos suelen optimizarse en cuanto a su potencia, su selectividad y sus propiedades físico-químicas, de modo que se consiga una buena biodisponibilidad. Se tiene en cuenta, asimismo, su potencial toxicidad. Así, una alta potencia *in vitro* se relaciona con una potencia *in vivo* también alta: la dosis total utilizada será más baja,

por lo que se reduce la probabilidad de que aparezca una respuesta tóxica inesperada (159,231). En este sentido, CBG040591 y CBG060392 presentan una potencia baja, que podría limitar su selectividad y toxicidad, ya que tendrían que emplearse dosis elevadas *in vivo* para alcanzar su actividad farmacológica.

Asimismo, ambas moléculas poseen una estructura heterocíclica que incluye fenoles, los cuales pueden condicionar su toxicidad *in vivo* así como su biodisponibilidad debido a sus propiedades físico-químicas. La presencia de fenoles en la estructura química de moléculas pequeñas se considera una alerta biológica. Esto se debe a que frecuentemente se asocian a la aparición de reacciones adversas a medicamentos, dado que los fenoles pueden evolucionar a quinonas, de alta reactividad (232,233). Sin embargo, en ocasiones no puede evitarse la presencia de fenoles puesto que son componentes básicos y frecuentes en las estructuras químicas, proporcionan actividad farmacológica y, de hecho, distintos fármacos con estructura fenólica utilizados actualmente son seguros para su uso en humanos (234).

Pese a estas limitaciones y dada la falta de moléculas de bajo peso molecular que antagonicen a la IL-17A o a su receptor, los ligandos CBG040591 y CBG060392 pueden considerarse un buen punto de partida químico para su optimización como herramientas farmacológicas que modulen el par IL-17A/IL-17RA en tejidos diana de la IL-17.

Debido a ello, se estableció como objetivo caracterizar la eficacia de los ligandos de IL-17A/IL-17RA, evaluando la capacidad de **CBG040591** y de **CBG060392** para **neutralizar la actividad proinflamatoria** de IL-17A en un contexto celular. Para ello se empleó la tecnología Luminex®, que permite cuantificar múltiples quimioquinas en una única muestra, utilizando el sobrenadante del cultivo celular tratado con IL-17A en presencia o no de los ligandos.

La determinación de quimioquinas liberadas al medio extracelular es un método adecuado para cuantificar la respuesta inflamatoria producida por IL-17A en sus células diana. La IL-17A

induce la liberación de citoquinas, MMPs, AMPs y quimioquinas que permiten amplificar y mantener la respuesta inflamatoria, lo que ocurre tanto en un estado fisiológico en respuesta a patógenos extracelulares como en estados patológicos en los que se encuentre sobreactivada la vía de IL-17. Así, se liberan quimioquinas como CXCL1, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL5, CCL2, CCL7 o CCL20, que actúan como factores quimiotácticos para otras células del sistema inmunitario (38,50).

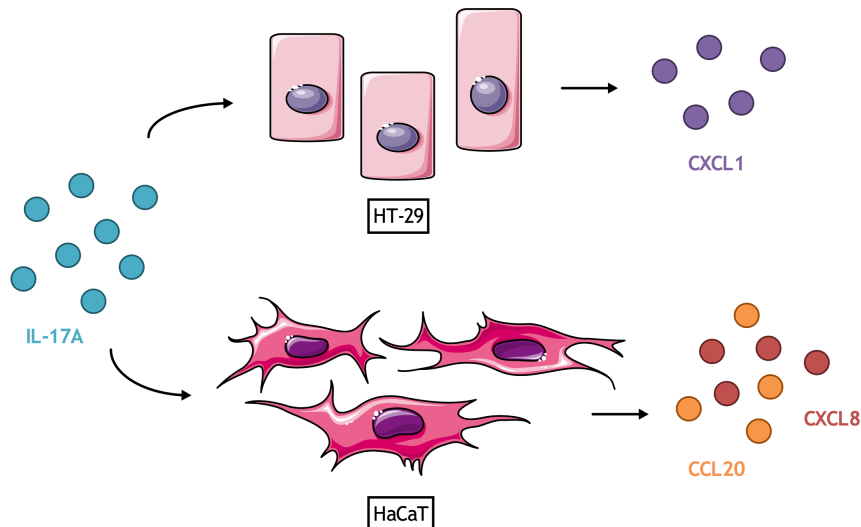


Figura 55. Esquema gráfico de los ensayos celulares de liberación de quimioquinas en respuesta a la vía inflamatoria IL-17A. Imagen realizada por la autora.

Para cuantificar la respuesta inflamatoria de la IL-17 en sus células diana se puso a punto un ensayo de liberación de **CXCL1** en la línea celular de adenocarcinoma colorrectal HT-29 (**figura 55**). Estas células expresan de forma constitutiva el receptor de IL-17A y se han utilizado de forma generalizada en el estudio de la eficacia herramientas farmacológicas que neutralizan esta citoquina en un contexto celular (178,235). Así, en el caso de la caracterización de ixekizumab, un anticuerpo anti-IL-17A aprobado para su uso en

psoriasis, se cuantificó su capacidad de neutralizar la producción de CXCL1 producida por la IL-17A en las células HT-29 (198). De forma análoga, estas células se han utilizado para identificar y caracterizar péptidos que se unen a los *hotspots* de IL-17A y ejercen un efecto farmacológico sobre la proteína (170).

Así pues, las células HT-29 se estimularon con concentraciones crecientes de IL-17A y se produjo la liberación de CXCL1 al sobrenadante del cultivo celular. La cantidad de CXCL1 liberada fue dependiente de la concentración de IL-17A empleada. Con el objetivo de validar esta respuesta se utilizó y confirmó el péptido anti-IL-17A IHVTIPADLWDWINK como inhibidor de esta citoquina en las células tumorales de colon, de forma similar a lo que se había descrito previamente (172). El péptido bloqueó de forma potente y completa la unión de IL-17A a su receptor en las células HT-29, con una IC₅₀ de 206,1 nM para la liberación de CXCL1.

Así, este péptido anti-IL-17A se empleó como control para la medida de la eficacia de CBG040591 y CBG060392 en la inhibición de IL-17A. Ambas moléculas bloquearon parcialmente la liberación de CXCL1 producida por IL-17A, con una IC₅₀ de 15,1 y 17,9 µM para CBG040591 y para CBG060392, respectivamente. Esto indica que ambos ligandos de IL-17RA bloquearon la respuesta inflamatoria de IL-17 en las células tumorales de cáncer colorrectal con una potencia en torno a cien veces menor que la del péptido empleado como control. Pese a esta potencia reducida, dichas estructuras químicas se consideran unos buenos puntos de partida para un programa de descubrimiento temprano de fármacos, frente a la mejor potencia del péptido, que debe su ventaja a su tamaño y a su diseño para la alteración de una diana proteína-proteína.

Para continuar con la evaluación de la eficacia de estas moléculas de bajo peso molecular como inhibidores de la actividad proinflamatoria de IL-17A en un contexto relevante para la psoriasis, se puso a punto un ensayo de liberación de **CCL20 e IL-8** en queratinocitos humanos. Se utilizó la línea celular HaCaT, una línea

de queratinocitos espontánea que expresa constitutivamente el receptor de IL-17A (**figura 55**) (206).

Además, esta línea celular de piel presenta las características morfológicas propias de los queratinocitos humanos, así como la presencia de citoqueratinas. Mediante técnicas de microscopía de alto contenido se observó la presencia de citoqueratina-17 en las células HaCaT, la cual es un marcador de hiperproliferación de los queratinocitos, indetectable en la piel normal. No obstante, esta citoqueratina se sobreexpresa en estados hiperproliferativos como los que se detectan en las lesiones de psoriasis. Por lo tanto, puede considerarse como uno de los marcadores clave de esta patología, ya que se correlaciona directamente con la gravedad de las manifestaciones clínicas (236–239).

La relación entre la sobreexpresión de la queratina-17 y la IL-17A implicaría que esta citoquina puede aumentar su expresión de forma dosis-dependiente en las células HaCaT (240). Asimismo, se ha visto que la IL-22 también puede inducir la queratina-17 (241,242). Pese a ello, en este trabajo y con un tratamiento con IL-17A durante 24 horas no se observó un incremento de la cantidad de citoqueratina-17 en los queratinocitos HaCaT. No obstante, sí que pueden existir cambios que conduzcan a un aumento de la expresión de esta queratina. Esto puede deberse a que el tiempo de estímulo no haya sido suficiente para observar dichos cambios. También se ha visto que la línea celular HaCaT podría no ser la más adecuada para reproducir una epidermis humana en toda su complejidad (243). Un sistema más complejo en el que se tenga en cuenta el tejido diana y la interacción con el sistema inmunitario sería una metodología facilitadora para desarrollar modelos traslacionales. Estos podrían aplicarse a proyectos de descubrimiento de fármacos para enfermedades autoinmunes.

En cualquier caso, los queratinocitos forman parte de un modelo experimental de uno de los órganos diana de IL-17, la piel y, por consiguiente, permiten caracterizar la actividad inhibidora de los ligandos de IL-17RA un contexto celular relevante para patologías

dermatológicas como la psoriasis (204,211,244). Los queratinocitos se ven afectados por la presencia excesiva de IL-17A en la psoriasis, una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de inflamación crónica. El papel central de la IL-17A en esta patología se ha confirmado de forma clara con el desarrollo clínico y la utilización de los anticuerpos terapéuticos anti-IL-17A, cuya eficacia clínica está ampliamente demostrada (14,92,96,98,245).

Las células HaCaT se estimularon con IL-17A en presencia de TNF α . El uso de TNF α , y no solo de IL-17A, se justifica debido al hecho de que este sinergiza con IL-17A para producir una respuesta inflamatoria cuantificable en los queratinocitos (246–248). Cada una de estas citoquinas empleadas de forma independiente también producen una respuesta, sin embargo, juntas intensifican la liberación de citoquinas inflamatorias, dado que su combinación es sinérgica (208,248,249).

Esta liberación sinérgica de citoquinas inflamatorias es especialmente relevante en la patogénesis de la psoriasis (208,250). Así, las células dendríticas de la piel se activan y secretan IL-23 e IL-12, que estimulan a los linfocitos correspondientes: Th17 y Tc17, y Th1 (85,91). Estas células T activadas mantienen la inflamación con la producción de IL-17, IL-22, TNF α e IL-26, que contribuyen a la aparición de las manifestaciones de la psoriasis en la piel. Los queratinocitos activados por estas citoquinas responden liberando quimioquinas y determinados péptidos antimicrobianos (85,93–96).

Por lo tanto, los queratinocitos humanos tratados con las citoquinas producidas por los linfocitos Th17 incrementan la expresión de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias relacionadas con la psoriasis (206). Así pues, las células HaCaT estimuladas con IL-17A en presencia de TNF α liberaron CCL20 e IL-8 en respuesta a estos estímulos proinflamatorios (246–248). Las concentraciones de CCL20 e IL-8 observadas en el medio de cultivo fueron proporcionales a las utilizadas como estímulo. Asimismo, pudieron observarse las diferencias en la cantidad de CCL20 o IL-8 liberada en respuesta a IL-17A (100 ng/ml), IL-17A (100 ng/ml) en

presencia de TNF α (10 ng/ml) o TNF α solo (10 ng/ml). De esta manera, se observaron diferencias significativas con la utilización conjunta de IL-17A y TNF α , que produjeron un incremento de la liberación de citoquinas superior a estas empleadas por separado, en línea, por lo tanto, con lo descrito en la literatura científica.

Estos datos permitieron validar el modelo de queratinocitos humanos para el estudio de la presente tesis doctoral, de forma que se pudieran evaluar herramientas farmacológicas que inhiban la IL-17A, con una respuesta trasladable a la que se produciría en la psoriasis. En este sentido, se utilizó el mismo péptido anti-IL-17A que en el ensayo de liberación de CXCL1 en las células HT-29. Dicho péptido bloqueó de forma potente y total la actividad proinflamatoria de IL-17A acompañada de TNF α en los queratinocitos, con una IC₅₀ para la liberación de CCL20 e IL-8 en el rango nanomolar alto (IC₅₀ de 378 nM y 736 nM, respectivamente). Estos datos son consistentes con lo que se había descrito previamente en queratinocitos primarios humanos, donde el péptido anti-IL-17A también inhibe la liberación de CCL20 e IL-8 con unas IC₅₀ dentro de este rango nanomolar (172). Así pues, el péptido anti-IL-17A se utilizó como control para evaluar la eficacia de los ligandos CBG040591 y CBG060392.

En este modelo de queratinocitos, ambas moléculas bloquearon parcialmente la liberación de CCL20 e IL-8 producidas por la estimulación con IL-17A en presencia de TNF α , con unas IC₅₀ de 20,9 y 23,6 μ M para CCL20, y de 26,7 y 45,3 μ M para IL-8. Concretamente, CBG060392 y CBG040591 redujeron la respuesta máxima de IL-17A y TNF α en un 75 % para la liberación de CCL20. En el caso de la IL-8, CBG060392 también redujo la respuesta máxima de IL-17A y TNF α en un 75 %, mientras que CBG040591 solo lo hizo en un 50 %.

Este efecto inhibitor, de igual modo que ocurría en las células tumorales de colon con la liberación de CXCL1, puede explicarse por la afinidad de CBG040591 y CBG060392 para la interacción entre IL-17A y el dominio extracelular de IL-17RA, tal y como se describió en el modelo de unión simulado mediante *docking*. Así pues, los

ligandos parecen bloquear dicha interacción proteína-proteína y, además, reducen la liberación de quimioquinas inflamatorias mediada por IL-17A en presencia de TNF α en los queratinocitos humanos.

Para evaluar si la respuesta inhibidora de CBG040591 y CBG060392 es específica de la liberación de quimioquinas mediada por IL-17A, los queratinocitos se estimularon con TNF α en ausencia de IL-17A. CBG040591 inhibió la liberación de IL-8 y CCL20 a concentraciones altas, indicando que puede ser un inhibidor no selectivo de la interacción entre IL-17A y su receptor. Sin embargo, CBG060392 no inhibe la liberación de IL-8 ni de CCL20 inducidas por TNF α y puede definirse como específico para la inhibición de la unión ligando-receptor de IL-17A. Esta diferencia entre ambas moléculas podría explicarse por la diferencia en sus estructuras químicas (quinazolinona y pirrolidina-2,5-diona, respectivamente). Esto podría investigarse mediante estudios de relación estructura-actividad, en los que se evaluarían una serie de derivados sintéticos mediante metodologías biofísicas y basadas en células desarrolladas en este trabajo de tesis doctoral.

Hasta aquí hemos demostrado que CBG040591 y CBG060392 alteraron la interacción IL-17A/IL-17RA y produjeron una inhibición directa sobre el efecto proinflamatorio de esta citoquina sobre la liberación de quimioquinas en las células diana de la IL-17A. Tanto en células tumorales de colon como en queratinocitos humanos se observó un bloqueo parcial de la liberación de CXCL1, CCL20 e IL-8, causado por la presencia de CBG040591 y CBG060392.

Debido a esto, decidimos evaluar si CBG040591 y CBG060392 alteran la **expresión de CCL20 y CXCL8** inducida por IL-17A en presencia de TNF α en queratinocitos humanos. Se utilizó el modelo de HaCaT por ser el más representativo y cercano a la psoriasis, cuya desregulación inmunitaria lleva a la presencia excesiva de citoquinas proinflamatorias como IL-17A y TNF α (211).

Para ello, se empleó la técnica de RT-qPCR, que permite cuantificar la expresión relativa de genes de interés en numerosos contextos de diagnóstico clínico y de investigación. En nuestro protocolo se usó como gen de referencia *36B4*, un gen que codifica una fosfoproteína ribosomal muy conservada en los órganos, tejidos y en distintas especies (217).

De manera análoga a la sinergia de IL-17A y de TNF α en la liberación de mediadores inflamatorios, la expresión de los genes diana de IL-17A es el resultado de la capacidad de la citoquina IL-17A para estabilizar los transcritos de ARNm inducidos por TNF α , que son inestables de forma intrínseca. Esta inestabilidad intrínseca es un mecanismo fisiológico que permite evitar el daño tisular derivado de la expresión de genes inflamatorios tras la desaparición de la inflamación (8,60,251).

Por lo tanto, los queratinocitos humanos HaCaT se estimularon con IL-17A, TNF α o IL-17A en presencia de TNF α . La respuesta en la expresión de las quimioquinas *CCL20* y *CXCL8*, mediadoras de la respuesta inflamatoria en los tejidos diana, fue consistente con los datos obtenidos en los experimentos de liberación de citoquinas, de forma que se observó una respuesta sinérgica con la utilización conjunta ambas citoquinas, especialmente marcada en el caso de *CCL20*. Con el objetivo de comparar este ensayo de expresión con los datos de liberación de citoquinas, se empleó el mismo péptido anti-IL-17A como referencia de respuesta farmacológica inhibitoria. Dicho péptido redujo de forma significativa la transcripción proinflamatoria en los queratinocitos, de forma análoga a la reducción de la liberación de estas quimioquinas en respuesta al estímulo inflamatorio de IL-17A y TNF α .

La interrupción de la interacción IL-17A/IL-17RA producida por CBG040591 y CBG060392 se tradujo en una expresión reducida de *CCL20* y *CXCL8*, que se correlacionó con los datos de liberación de quimioquinas obtenidos. Sin embargo, solamente CBG060392 mostró una inhibición significativa de la expresión de *CCL20* y *CXCL8* en los queratinocitos estimulados con IL-17A y TNF α . Esta actividad

inhibitoria de CBG060392 indica que este ligando bloqueó la expresión de los genes diana proinflamatorios de IL-17A (**figura 56**).

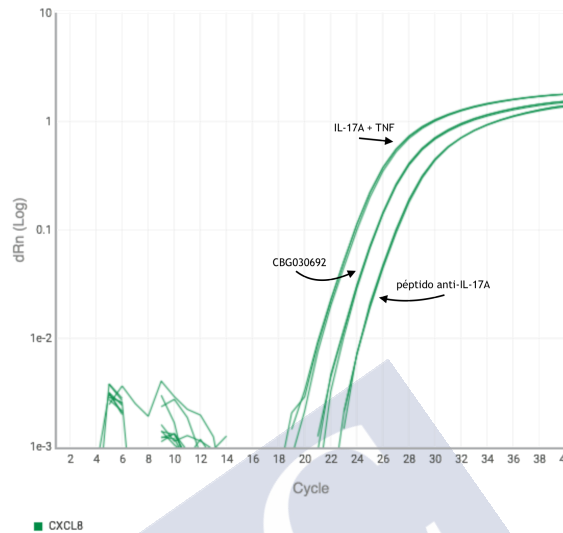


Figura 56. Efecto del ligando CBG060392 sobre la expresión de CXCL8 determinado mediante RT-qPCR. Se muestran los ciclos de la RT-qPCR y los valores de fluorescencia correspondientes a cada muestra: IL-17A + TNF; IL-17A + TNF en presencia del péptido control; e IL-17A + TNF en presencia del ligando CBG060392.

Así pues, en este modelo la cuantificación de la expresión de *CCL20* y *CXCL8* es congruente con las observaciones de la liberación extracelular de quimioquinas en los queratinocitos humanos. Por lo tanto, la evaluación de la expresión génica podría utilizarse como criterio de valoración en estudios preliminares en el descubrimiento de nuevos ligandos para IL-17/IL-17R (252,253).

Para continuar con la caracterización farmacológica de CBG040591 y CBG060392 como ligandos que alteran la unión proteína-proteína entre IL-17A y su receptor, se evaluó la actividad

antiinflamatoria de ambas moléculas en relación a su efecto sobre la **vía de señalización** canónica de **NF- κ B**. Dicho complejo controla la transcripción del ADN, la producción de citoquinas y la supervivencia celular. Además, es una de las vías de señalización del receptor de IL-17, que recluta a Act1 a través de su dominio SEFIR. Act1 ubiquitina TRAF6 que, a su vez, activa la vía de NF- κ B (8). Pese a que IL-17A solo tiene un efecto leve en la activación de esta cascada, TNF α también la activa. La cooperación entre ambas citoquinas permite que IL-17A ejerza un efecto inflamatorio potente (8,249,253–255).

Para medir la activación de esta cascada se determinó el efecto de CBG040591 y CBG060392 sobre las proteínas p65 (también denominada RelA) e I κ B α . La primera es uno de los factores de transcripción de la familia de NF- κ B (256). I κ B α es uno de los miembros de la familia I κ B que secuestran los factores de transcripción NF- κ B en el citoplasma. Cuando I κ B α es fosforilada se activa para procesos de ubiquitinación y degradación, lo que posibilita la activación del complejo NF- κ B, que se transloca finalmente al interior del núcleo y activa el proceso inflamatorio (257) (**figura 57**).



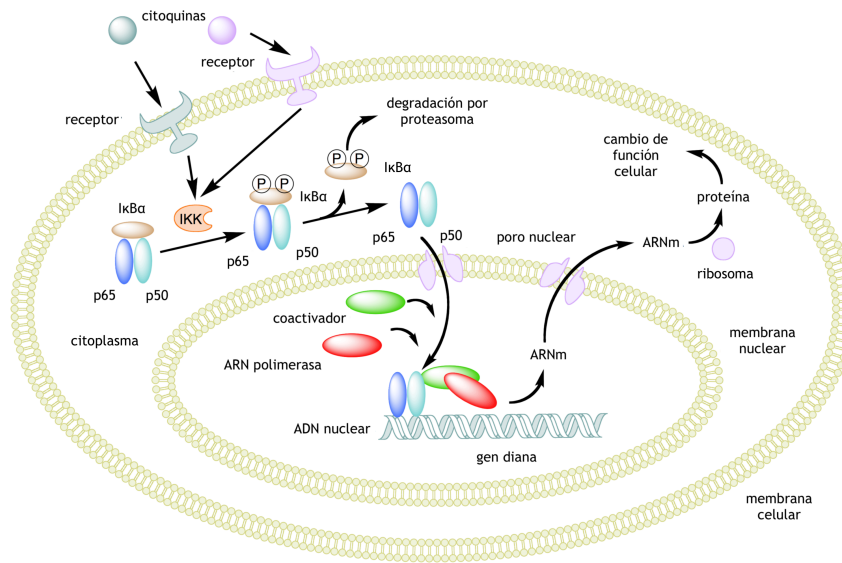


Figura 57. Vía de señalización intracelular de NF-κB activada en respuesta a citoquinas. Imagen modificada de Wikimedia Commons.

Los niveles de expresión de NF-κB p65 e IκBα fueron similares tanto para las células no estimuladas y estimuladas con IL-17A y TNFα. Lo mismo ocurre en presencia de CBG040591 y CBG060392. Esto es indicativo de la presencia de estas proteínas como parte constitutiva de las vías inflamatorias en las células HaCaT. Mediante la estimulación con IL-17A y TNFα durante 24 horas se observó un incremento en la fosforilación de NF-κB p65, que pareció no verse atenuada por la presencia de CBG040591 o CBG060392. Dicha estimulación también incrementó la presencia de IκBα fosforilada, que tampoco se atenuó con la utilización de CBG040591.

No obstante, CBG060392 inhibió la fosforilación de IκBα en la serina 32, donde ocurre el evento de marcaje inicial para la degradación de esta proteína. Esta inhibición de IκBα puede ser el resultado del bloqueo de la interacción entre IL-17A e IL-17RA por

acción de CBG060392 y, por lo tanto, de la vía de señalización canónica de NF- κ B. Como vía central en la inflamación activada en respuesta a varios receptores de citoquinas, su desregulación se relaciona con distintas enfermedades inflamatorias, incluidas las autoinmunes (257).

Al regular los factores de transcripción NF- κ B, I κ B α controla las respuestas inmunitaria e inflamatoria, la activación y la función efectora de los linfocitos T inflamatorios, así como la división celular y la apoptosis. Estos eventos celulares se asocian con distintas patologías, especialmente aquellas que presentan un estado de inflamación crónica, que incluyen la artritis reumatoide, la aterosclerosis, la esclerosis múltiple, el asma o la enfermedad inflamatoria intestinal (257,258).

Esta actividad antiinflamatoria parcial sobre IL-17A está alineada con la selectividad de CBG060392 observada previamente sobre el bloqueo de la expresión de los genes diana proinflamatorios de IL-17A, así como el consiguiente bloqueo de la liberación de quimioquinas asociadas a dicha interleuquina. Esto sugiere que este ligando podría ser un punto de partida prometedor para continuar un programa translacional de descubrimiento temprano de fármacos dirigidos a la interacción entre IL-17A e IL-17RA.

La actividad antiinflamatoria de CBG040591 y CBG060392 se evaluó, asimismo, en relación a su actividad intracelular en otras vías de señalización del receptor de IL-17A relevantes para su eficacia terapéutica. El efecto de CBG040591 y CBG060392 sobre la **expresión de C/EBP β** se analizó mediante RT-qPCR. La expresión de este factor de transcripción se ve incrementada por la activación de la señalización de la interleuquina 17A. De hecho, algunos de los genes diana de esta citoquina tienen que ser inducidos necesariamente por esta proteína o por C/EBP δ , sin la participación de la cascada de NF- κ B (8,43).

Además, C/EBP β se fosforila como consecuencia de la señalización procedente de las vías de ERK1/2 and GSK3 β , cuya activación deriva de la transducción de la señal del IL-17R

desencadenada por la unión de IL-17A (35,42). Estas fosforilaciones podrían relacionar a C/EBP β con una regulación negativa de IL-17A (43,259).

La cooperación funcional entre IL-17A y TNF α en la inflamación está mediada, además de por otros mecanismos, por la activación de la familia de C/EBP (61). En los resultados de este trabajo se ha observado dicha cooperación con el uso conjunto de ambas citoquinas, que resultó en un incremento de la expresión de *CEBPB*. La interrupción de la interacción proteína-proteína IL-17A/IL-17RA por acción de los ligandos CBG040591 y CBG060392 produjo un descenso significativo en la expresión de *CEBPB*, evitando la transducción de la cascada del receptor de IL-17A. C/EBP β regula la activación y la expresión de algunos genes diana de IL-17; así pues, esta actividad inhibitoria de CBG040591 y CBG060392 fue consistente con los resultados obtenidos en la expresión y liberación de quimioquinas.

También se evaluó la actividad de CBG040591 y CBG060392 sobre la **expresión de Regnasa-1 (ZC3H12A)**. Esta es una proteína de la familia estructural de los dedos de zinc con actividad RNasa y, en consecuencia, puede degradar directamente el ARNm de los genes diana de IL-17, inhibiendo la respuesta funcional de esta citoquina. Así pues, se trata de un mecanismo postranscripcional clave para la señalización proinflamatoria de IL-17, que puede resultar potencialmente destructiva en contextos de enfermedad (38).

La expresión de Regnasa-1 está inducida por IL-17 a través de NF- κ B. Además de esta inducción, los transcritos de *ZC3H12A* son estabilizados a través de la proteína DEAD-box DDX3X. Dicha proteína forma un complejo con Act1 y promueve la estabilidad del ARNm de *ZC3H12A* (47,260). Esta inducción de la *ZC3H12A* mediada por IL-17 se observó en nuestro modelo de queratinocitos.

Aunque CBG040591 pareció reducir la expresión de *ZC3H12A*, solo el ligando CBG060392 mostró una inhibición significativa de *ZC3H12A* en queratinocitos humanos. Esto implicaría que las estructuras basadas en pirrolidina-2,5-diona podrían estar

impidiendo la activación de la transducción del receptor de IL-17A de forma selectiva. En consecuencia, la regulación postranscripcional de IL-17A, esto es, la expresión de *ZC3H12A* también está significativamente reducida.

En resumen, los resultados de esta tesis doctoral demuestran que los ligandos de bajo peso molecular identificados se unen al receptor IL-17RA y a la IL-17A y poseen un efecto inhibidor robusto en la producción de quimioquinas inflamatorias en queratinocitos humanos, por lo que podrían ser moduladores de la respuesta inmunitaria alterada que ocurre en la piel de los pacientes con psoriasis.





CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis doctoral demuestran que la interacción entre IL-17A e IL-17RA puede ser modulada farmacológicamente por nuevos ligandos de bajo peso molecular identificados mediante la aplicación de un programa de descubrimiento temprano de fármacos.

1. Se identificaron dos nuevos ligandos de bajo peso molecular para la interacción entre IL-17A e IL-17RA.

- 1.1. Se generó una quimioteca focalizada de 67 ligandos de IL-17A/IL-17RA mediante un cribado virtual de su afinidad teórica por esta interacción.
- 1.2. Dos de los ligandos priorizados (CBG040591 y CBG060392) tuvieron afinidad micromolar para la unión a la interacción IL-17A/IL-17RA.
- 1.3. Los ligandos CBG040591 y CBG060392, con estructuras de quinazolinona y pirrolidinadiona, interaccionaron con residuos comunes de la interacción proteína-proteína entre IL-17A e IL-17RA.

2. Se evaluó la eficacia antiinflamatoria de los ligandos CBG040591 y CBG060392 en respuesta a la estimulación con IL-17A.

- 2.1. Los ligandos CBG040591 y CBG060392 inhibieron la liberación de CXCL1 en células tumorales de colon con una IC₅₀ de 15,1 y 17,9 μ M, respectivamente.

- 2.2. Los ligandos CBG040591 y CBG060392 inhibieron la liberación de CCL20 e IL-8 en queratinocitos humanos, con una IC_{50} de 20,9 y 23,6 μ M para CCL20, y de 26,7 y 45,3 μ M para IL-8.
- 2.3. El ligando CBG060392 redujo significativamente la expresión de *CCL20* y *CXCL8* en queratinocitos humanos.

3. CBG040591 y CBG060392 ejercieron un efecto inhibitorio sobre la señalización intracelular del receptor de IL-17A en queratinocitos humanos.

- 3.1. El ligando CBG060392 inhibió parcialmente la señalización inflamatoria NF- κ B en queratinocitos, a nivel de I κ B α . CBG040591 no produjo una inhibición significativa.
- 3.2. Los ligandos CBG040591 y CBG060392 redujeron significativamente la expresión de C/EBP β .
- 3.3. El ligando CBG060392 inhibió la señalización postranscripcional de IL-17RA a nivel de Regnasa-1 de forma significativa. CBG040591 no produjo una inhibición significativa de Regnasa-1.

CONCLUSIONS

The results of this doctoral thesis demonstrate that the interaction between IL-17A and IL-17RA may be pharmacologically modulated by novel small-molecule ligands identified by means of an early drug discovery program.

1. Two novel small molecules for the interaction between IL-17A and IL-17RA were identified.

- 1.1. A focused library of 67 IL 17A/IL-17RA ligands was generated by virtual screening in relation to their theoretical affinity for this interaction.
- 1.2. Two of the prioritized ligands (CBG040591 and CBG060392) had micromolar affinity for the binding to the IL-17A/IL-17RA interaction.
- 1.3. CBG040591 and CBG060392 ligands, with quinazolinone and pyrrolidinedione structures, interacted with common residues of the protein-protein interaction between IL-17A and IL-17RA.

2. The antiinflammatory efficacy of CBG040591 and CBG060392 ligands in response to stimulation with IL-17A was evaluated.

- 2.1. CBG040591 and CBG060392 ligands inhibited CXCL1 release in colon cancer cells with an IC_{50} of 15.1 and 17.9 μ M, respectively.
- 2.2. CBG040591 and CBG060392 ligands inhibited CCL20 and IL-8 release in colon cancer cells with an IC_{50} of 20.9 and 23.6 μ M for CCL20, and 26.7 y 45.3 μ M for IL-8.

2.3. *CBG060392 ligand significantly reduced CCL20 and CXCL8 expression in human keratinocytes.*

3. *CBG040591 and CBG060392 had an inhibitory effect on the IL-17A receptor intracellular signalling in human keratinocytes.*

3.1. *CBG060392 ligand partially inhibited the NF- κ B inflammatory signalling in keratinocytes, at I κ B α . CBG040591 did not produce a significant inhibition.*

3.2. *CBG040591 and CBG060392 ligands significantly reduced the expression of C/EBP β .*

3.3. *CBG060392 ligand significantly inhibited the IL-17RA post-transcriptional signalling at Regnase-1. CBG040591 did not produce a significant Regnase-1 inhibition.*





REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation, and Pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27-37.
2. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014;1843(11):2563-82.
3. Holdsworth SR, Can PY. Cytokines: Names and numbers you should care about. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(12):2243-54.
4. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):485-517.
5. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2014;74(1):1043-4666.
6. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK, Eyerich K, Eyerich K, Dimartino V, et al. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009;361(9):888-98.
7. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*. 2007;37(SUPPL. 1):34-45.
8. Amatya N, Garg A V., Gaffen SL. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol*. 2017;38(5):310-22.
9. Beringer A, Noack M, Miossec P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. *Trends Mol Med*. 2016;22(3):230-41.
10. Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P.

- CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol.* 15 de junio de 1993;150(12):5445 LP - 5456.
11. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1133-41.
 12. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1123-32.
 13. Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: Regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(6):413-23.
 14. Brembilla NC, Senra L, Boehncke W-H. The IL-17 Family of Cytokines in Psoriasis: IL-17A and Beyond. *Front Immunol.* 2 de agosto de 2018;9.
 15. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):556-67.
 16. Zhang B, Liu C, Qian W, Han Y, Li X, Deng J. Structure of the unique SEFIR domain from human interleukin 17 receptor A reveals a composite ligand-binding site containing a conserved-helix for Act1 binding and IL-17 signaling. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr.* 2014;70(5):1476-83.
 17. Toy D, Kugler D, Wolfson M, Bos T Vanden, Gurgel J, Derry J, et al. Cutting Edge: Interleukin 17 Signals through a Heteromeric Receptor Complex. *J Immunol.* 1 de julio de 2006;177(1):36-9.
 18. Rickel EA, Siegel LA, Yoon B-RP, Rottman JB, Kugler DG, Swart DA, et al. Identification of Functional Roles for Both IL-17RB and IL-17RA in Mediating IL-25-Induced Activities. *J*

- Immunol. 15 de septiembre de 2008;181(6):4299-310.
19. Ramirez-Carrozzi V, Sambandam A, Luis E, Lin Z, Jeet S, Lesch J, et al. IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nat Immunol.* 12 de diciembre de 2011;12(12):1159-66.
 20. Shi Y, Ullrich SJ, Zhang J, Connolly K, Grzegorzewski KJ, Barber MC, et al. A novel cytokine receptor-ligand pair: Identification, molecular characterization, and in vivo immunomodulatory activity. *J Biol Chem.* 2000;
 21. Monin L, Gaffen SL. Interleukin 17 Family Cytokines : Signaling and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;1-18.
 22. Goepfert A, Lehmann S, Wirth E, Rondeau J. The human IL-17A / F heterodimer : a two-faced cytokine with unique receptor recognition properties. *Sci Rep.* 2017;(July):1-13.
 23. Liu S, Song X, Chrnyk B a, Shanker S, Hoth LR, Marr ES, et al. Crystal structures of interleukin 17A and its complex with IL-17 receptor A. *Nat Commun.* 21 de octubre de 2013;4(1):1888.
 24. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):479-89.
 25. Villanova F, Flutter B, Tosi I, Grys K, Sreeneebus H, Perera GK, et al. Characterization of Innate Lymphoid Cells in Human Skin and Blood Demonstrates Increase of NKp44+ ILC3 in Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2014;134(4):984-91.
 26. Veldhoen M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat Immunol.* 2017;18(6):612-21.
 27. Patel DD, Kuchroo VK. Th17 Cell Pathway in Human Immunity: Lessons from Genetics and Therapeutic Interventions. *Immunity.* 2015;43(6):1040-51.
 28. Yang J, Sundrud MS, Skepner J, Yamagata T. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. *Trends Pharmacol Sci.*

2014;35(10):493-500.

29. Fotiadou C, Lazaridou E, Sotiriou E, Ioannides D. Targeting IL-23 in psoriasis: current perspectives. *Psoriasis Targets Ther.* 2018;Volume 8:1-5.
30. Sun N, Guo H, Wang Y. Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma-t (ROR γ t) inhibitors in clinical development for the treatment of autoimmune diseases: a patent review (2016-present). *Expert Opin Ther Pat.* 2019;29(9):663-74.
31. Tang C, Chen S, Qian H, Huang W. Interleukin-23: As a drug target for autoimmune inflammatory diseases. *Immunology.* 2012;135(2):112-24.
32. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau A-M, Painter SL, Comeau MR, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity.* diciembre de 1995;3(6):811-21.
33. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, et al. Differential Roles of Interleukin-17A and -17F in Host Defense against Mucoepithelial Bacterial Infection and Allergic Responses. *Immunity.* enero de 2009;30(1):108-19.
34. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine.* 2013;64(2):477-85.
35. Li X, Bechara R, Zhao J, McGeachy MJ, Gaffen SL. IL-17 receptor-based signaling and implications for disease. *Nat Immunol.* 2019;20(12):1594-602.
36. Seon HC, Park H, Dong C. Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *J Biol Chem.* 2006;281(47):35603-7.
37. Herjan T, Hong L, Bubenik J, Bulek K, Qian W, Liu C, et al. IL-17-receptor-associated adaptor Act1 directly stabilizes mRNAs to mediate IL-17 inflammatory signaling. *Nat Immunol.* 2018;19(4):354-65.

38. McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*. 2019;50(4):892-906.
39. Swaidani S, Liu C, Zhao J, Bulek K, Li X. TRAF regulation of IL-17 cytokine signaling. *Front Immunol*. 2019;10(JUN):1-7.
40. Liu C, Qian W, Qian Y, Giltiay N V., Lu Y, Swaidani S, et al. Act1, a U-box E3 Ubiquitin Ligase for IL-17 Signaling. *Sci Signal*. 13 de octubre de 2009;2(92):ra63-ra63.
41. Napetschnig J, Wu H. Molecular Basis of NF- κ B Signaling. *Annu Rev Biophys*. 6 de mayo de 2013;42(1):443-68.
42. Cortez DM, Feldman MD, Mummidi S, Valente AJ, Steffensen B, Vincenti M, et al. IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP- β , NF- κ B, and AP-1 activation. *Am J Physiol Circ Physiol*. diciembre de 2007;293(6):H3356-65.
43. Patel DN, King CA, Bailey SR, Holt JW, Venkatachalam K, Agrawal A, et al. Interleukin-17 Stimulates C-reactive Protein Expression in Hepatocytes and Smooth Muscle Cells via p38 MAPK and ERK1/2-dependent NF- κ B and C/EBP β Activation. *J Biol Chem*. 14 de septiembre de 2007;282(37):27229-38.
44. Sun D, Novotny M, Bulek K, Liu C, Li X, Hamilton T. Treatment with IL-17 prolongs the half-life of chemokine CXCL1 mRNA via the adaptor TRAF5 and the splicing-regulatory factor SF2 (ASF). *Nat Immunol*. 7 de septiembre de 2011;12(9):853-60.
45. Herjan T, Yao P, Qian W, Li X, Liu C, Bulek K, et al. HuR Is Required for IL-17-Induced Act1-Mediated CXCL1 and CXCL5 mRNA Stabilization. *J Immunol*. 15 de julio de 2013;191(2):640-9.
46. Mino T, Murakawa Y, Fukao A, Vandenbon A, Wessels H-H, Ori D, et al. Regnase-1 and Roquin Regulate a Common Element in Inflammatory mRNAs by Spatiotemporally Distinct

Mechanisms. Cell. mayo de 2015;161(5):1058-73.

47. Garg A V., Amatya N, Chen K, Cruz JA, Grover P, Whibley N, et al. MCP1 Endonuclease Activity Negatively Regulates Interleukin-17-Mediated Signaling and Inflammation. *Immunity*. 2015;43(3):475-87.
48. Zhu S, Pan W, Shi P, Gao H, Zhao F, Song X, et al. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis through TRAF3-mediated suppression of interleukin 17 receptor signaling. *J Exp Med*. 22 de noviembre de 2010;207(12):2647-62.
49. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S, Dobritsa S V., Kuok IT, et al. Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. *J Biomol Screen*. 2012;6(4):787-96.
50. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: Mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*. 2010;129(3):311-21.
51. Ye P, Garvey PB, Zhang P, Nelson S, Bagby G, Summer WR, et al. Interleukin-17 and Lung Host Defense against *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. septiembre de 2001;25(3):335-40.
52. Liu J, Feng Y, Yang K, Li Q, Ye L, Han L, et al. Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. marzo de 2011;61(2):179-88.
53. Cho JS, Pietras EM, Garcia NC, Ramos RI, Farzam DM, Monroe HR, et al. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J Clin Invest*. 3 de mayo de 2010;120(5):1762-73.
54. Kagami S, Rizzo HL, Kurtz SE, Miller LS, Blauvelt A. IL-23 and IL-17A, but Not IL-12 and IL-22, Are Required for Optimal Skin Host Defense against *Candida albicans*. *J Immunol*. 1 de noviembre de 2010;185(9):5453-62.

55. Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science*. 1 de abril de 2011;332(6025):65-8.
56. Conti HR, Gaffen SL. IL-17–Mediated Immunity to the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida albicans*. *J Immunol*. 1 de agosto de 2015;195(3):780-8.
57. Li J, Casanova J-L, Puel A. Mucocutaneous IL-17 immunity in mice and humans: host defense vs. excessive inflammation. *Mucosal Immunol*. 29 de mayo de 2018;11(3):581-9.
58. Ogura H, Murakami M, Okuyama Y, Tsuruoka M, Kitabayashi C, Kanamoto M, et al. Interleukin-17 Promotes Autoimmunity by Triggering a Positive-Feedback Loop via Interleukin-6 Induction. *Immunity*. 2008;29(4):628-36.
59. Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, Sharma A, Gaffen SL. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol*. julio de 2004;76(1):135-44.
60. Hartupée J, Liu C, Novotny M, Li X, Hamilton T. IL-17 Enhances Chemokine Gene Expression through mRNA Stabilization. *J Immunol*. 2007;179(6):4135-41.
61. Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, Sharma A, Gaffen SL. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol*. 23 de julio de 2004;76(1):135-44.
62. Liang SC, Tan X-Y, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*. 2 de octubre de 2006;203(10):2271-9.
63. Soderstrom C, Bernstein G, Zhang W, Valdez H, Fitz L, Kuhn M, et al. Ultra-Sensitive Measurement of IL-17A and IL-17F in

- Psoriasis Patient Serum and Skin. *AAPS J.* 22 de julio de 2017;19(4):1218-22.
64. Johansen C, Usher PA, Kjellerup RB, Lundsgaard D, Iversen L, Kragballe K. Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol.* 2009;160(2):319-24.
 65. Johnston A, Fritz Y, Dawes SM, Diaconu D, Al-Attar PM, Guzman AM, et al. Keratinocyte Overexpression of IL-17C Promotes Psoriasiform Skin Inflammation. *J Immunol.* 1 de marzo de 2013;190(5):2252-62.
 66. Angkasekwinai P, Park H, Wang Y-H, Wang Y-H, Chang SH, Corry DB, et al. Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med.* 9 de julio de 2007;204(7):1509-17.
 67. Menon B, Gullick NJ, Walter GJ, Rajasekhar M, Garrood T, Evans HG, et al. Interleukin-17+CD8+ T Cells Are Enriched in the Joints of Patients With Psoriatic Arthritis and Correlate With Disease Activity and Joint Damage Progression. *Arthritis Rheumatol.* mayo de 2014;66(5):1272-81.
 68. Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Genovese MC. IL-17 receptor and its functional significance in psoriatic arthritis. *Mol Cell Biochem.* 6 de enero de 2012;359(1-2):419-29.
 69. Metawi SA, Abbas D, Kamal MM, Ibrahim MK. Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA. *Clin Rheumatol.* 29 de septiembre de 2011;30(9):1201-7.
 70. Mei Y, Pan F, Gao J, Ge R, Duan Z, Zeng Z, et al. Increased serum IL-17 and IL-23 in the patient with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol.* 17 de febrero de 2011;30(2):269-73.
 71. Ciccica F, Guggino G, Rizzo A, Saieva L, Peralta S, Giardina A, et al. Type 3 innate lymphoid cells producing IL-17 and IL-22

- are expanded in the gut, in the peripheral blood, synovial fluid and bone marrow of patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* septiembre de 2015;74(9):1739-47.
72. Lande R, Botti E, Jandus C, Dojcinovic D, Fanelli G, Conrad C, et al. The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nat Commun.* 3 de diciembre de 2014;5(1):5621.
 73. Tzartos JS, Friesse MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. *Am J Pathol.* enero de 2008;172(1):146-55.
 74. Ueno A, Jijon H, Chan R, Ford K, Hirota C, Kaplan GG, et al. Increased Prevalence of Circulating Novel IL-17 Secreting Foxp3 Expressing CD4+ T Cells and Defective Suppressive Function of Circulating Foxp3+ Regulatory Cells Support Plasticity Between Th17 and Regulatory T Cells in Inflammatory Bowel Disease Patients. *Inflamm Bowel Dis.* noviembre de 2013;19(12):2522-34.
 75. Sahin A, Calhan T, Cengiz M, Kahraman R, Aydin K, Ozdil K, et al. Serum Interleukin 17 Levels in Patients with Crohn's Disease: Real Life Data. *Dis Markers* [Internet]. 2014;2014:1-6. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/dm/2014/690853/>
 76. Leonardi S, Cuppari C, Manti S, Filippelli M, Parisi GF, Borgia F, et al. Serum interleukin 17, interleukin 23, and interleukin 10 values in children with atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS): Association with clinical severity and phenotype. *Allergy Asthma Proc.* 1 de enero de 2015;36(1):74-81.
 77. Chang SH. T helper 17 (Th17) cells and interleukin-17 (IL-17) in cancer. *Arch Pharm Res.* 2 de julio de 2019;42(7):549-59.
 78. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, et al. Clinical Impact of Different Classes of

- Infiltrating T Cytotoxic and Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Res.* 15 de febrero de 2011;71(4):1263-71.
79. Song Y, Yang JM. Role of interleukin (IL)-17 and T-helper (Th)17 cells in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;493(1):1-8.
 80. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med.* julio de 2009;361(5):496-509.
 81. Di Meglio P, Villanova F, Nestle FO. Psoriasis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* agosto de 2014;4(8).
 82. Lebwohl M. Psoriasis. *Ann Intern Med.* 3 de abril de 2018;168(7):ITC49.
 83. Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet.* 2007;370(9583):263-71.
 84. Boehncke W-H, Schön MP. Psoriasis. *Lancet.* 2015;386(9997):983-94.
 85. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis pathogenesis and treatment. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1-28.
 86. Coates LC, Aslam T, Al Balushi F, Burden AD, Burden-The E, Caperton AR, et al. Comparison of three screening tools to detect psoriatic arthritis in patients with psoriasis (CONTEST study). *Br J Dermatol.* abril de 2013;168(4):802-7.
 87. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: An indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008;17(12):1063-72.
 88. Schmitt J, Wozel G. The Psoriasis Area and Severity Index Is the Adequate Criterion to Define Severity in Chronic Plaque-Type Psoriasis. *Dermatology.* 2005;210(3):194-9.
 89. Roberson EDO, Bowcock AM. Psoriasis genetics: breaking the barrier. *Trends Genet.* septiembre de 2010;26(9):415-23.
 90. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating

- Th17, Th22, and Th1 Cells Are Increased in Psoriasis. *J Invest Dermatol*. 1 de mayo de 2010;130(5):1373-83.
91. Mylle S, Grine L, Speeckaert R, Lambert JLW, van Geel N. Targeting the IL-23/IL-17 Pathway in Psoriasis: the Search for the Good, the Bad and the Ugly. *Am J Clin Dermatol*. 2018;19(5):625-37.
 92. Blauvelt A, Chiricozzi A. The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018;55(3):379-90.
 93. Hijnen D, Knol EF, Gent YY, Giovannone B, Beijin SJP, Kupper TS, et al. CD8+ T Cells in the Lesional Skin of Atopic Dermatitis and Psoriasis Patients Are an Important Source of IFN- γ , IL-13, IL-17, and IL-22. *J Invest Dermatol*. abril de 2013;133(4):973-9.
 94. Di Meglio P, Villanova F, Navarini AA, Mylonas A, Tosi I, Nestle FO, et al. Targeting CD8+ T cells prevents psoriasis development. *J Allergy Clin Immunol*. julio de 2016;138(1):274-276.e6.
 95. Hawkes JE, Yan BY, Chan TC, Krueger JG. Discovery of the IL-23/IL-17 Signaling Pathway and the Treatment of Psoriasis. *J Immunol*. 2018;201(6):1605-13.
 96. Conrad C, Gilliet M. Psoriasis: from Pathogenesis to Targeted Therapies. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018;54(1):102-13.
 97. Keijsers RRM, Joosten I, van Erp PEJ, Koenen HJPM, van de Kerkhof PCM. Cellular sources of IL-17 in psoriasis: a paradigm shift? *Exp Dermatol*. noviembre de 2014;23(11):799-803.
 98. Chiricozzi A, Krueger JG. IL-17 targeted therapies for psoriasis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013;22(8):993-1005.
 99. Sakkas LI, Zafiriou E, Bogdanos DP. Mini review: New treatments in psoriatic arthritis. Focus on the IL-23/17 Axis. *Front Pharmacol*. 2019;10(JULY):1-8.

100. Glatt S, Baeten D, Baker T, Griffiths M, Ionescu L, Lawson ADG, et al. Dual IL-17A and IL-17F neutralisation by bimekizumab in psoriatic arthritis: evidence from preclinical experiments and a randomised placebo-controlled clinical trial that IL-17F contributes to human chronic tissue inflammation. *Ann Rheum Dis.* abril de 2018;77(4):523-32.
101. Lebwohl M, Strober B, Menter A, Gordon K, Weglowska J, Puig L, et al. Phase 3 Studies Comparing Brodalumab with Ustekinumab in Psoriasis. *N Engl J Med.* octubre de 2015;373(14):1318-28.
102. Thaçi D, Blauvelt A, Reich K, Tsai T-F, Vanaclocha F, Kingo K, et al. Secukinumab is superior to ustekinumab in clearing skin of subjects with moderate to severe plaque psoriasis: CLEAR, a randomized controlled trial. *J Am Acad Dermatol.* septiembre de 2015;73(3):400-9.
103. Blauvelt A, Gooderham M, Iversen L, Ball S, Zhang L, Agada NO, et al. Efficacy and safety of ixekizumab for the treatment of moderate-to-severe plaque psoriasis: Results through 108 weeks of a randomized, controlled phase 3 clinical trial (UNCOVER-3). *J Am Acad Dermatol.* noviembre de 2017;77(5):855-62.
104. Lebwohl M, Strober B, Menter A, Gordon K, Weglowska J, Puig L, et al. Phase 3 Studies Comparing Brodalumab with Ustekinumab in Psoriasis. *N Engl J Med.* octubre de 2015;373(14):1318-28.
105. Langley RG, Lebwohl M, Krueger GG, Szapary PO, Wasfi Y, Chan D, et al. Long-term efficacy and safety of ustekinumab, with and without dosing adjustment, in patients with moderate-to-severe psoriasis: results from the PHOENIX 2 study through 5 years of follow-up. *Br J Dermatol.* mayo de 2015;172(5):1371-83.
106. Blauvelt A, Papp KA, Griffiths CEM, Randazzo B, Wasfi Y, Shen Y-K, et al. Efficacy and safety of guselkumab, an anti-

- interleukin-23 monoclonal antibody, compared with adalimumab for the continuous treatment of patients with moderate to severe psoriasis: Results from the phase III, double-blinded, placebo- and active comparator-. *J Am Acad Dermatol.* marzo de 2017;76(3):405-17.
107. Sinclair R, Thirthar Palanivelu V. Tildrakizumab for the treatment of psoriasis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2 de enero de 2019;15(1):5-12.
 108. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell.* septiembre de 2006;126(6):1121-33.
 109. Tang L, Yang X, Liang Y, Xie H, Dai Z, Zheng G. Transcription factor retinoid-related orphan receptor γ t: A promising target for the treatment of psoriasis. *Front Immunol.* 2018;9(MAY).
 110. Huh JR, Leung MWL, Huang P, Ryan DA, Krout MR, Malapaka RR V., et al. Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t activity. *Nature.* 27 de abril de 2011;472(7344):486-90.
 111. Solt LA, Kumar N, Nuhant P, Wang Y, Lauer JL, Liu J, et al. Suppression of TH17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature.* 17 de abril de 2011;472(7344):491-4.
 112. Kumar N, Lyda B, Chang MR, Lauer JL, Solt LA, Burris TP, et al. Identification of SR2211: A Potent Synthetic ROR γ -Selective Modulator. *ACS Chem Biol.* 20 de abril de 2012;7(4):672-7.
 113. Griffiths CEM, Reich K, Lebwohl M, Van De Kerkhof P, Paul C, Menter A, et al. Comparison of ixekizumab with etanercept or placebo in moderate-to-severe psoriasis (UNCOVER-2 and UNCOVER-3): Results from two phase 3 randomised trials. *Lancet.* 2015;386(9993):541-51.
 114. Papp K, Leonardi C, Menter A, Thompson EH, Milmont CE,

- Kricorian G, et al. Safety and efficacy of brodalumab for psoriasis after 120 weeks of treatment. *J Am Acad Dermatol*. diciembre de 2014;71(6):1183-1190.e3.
115. Papp KA, Merola JF, Gottlieb AB, Griffiths CEM, Cross N, Peterson L, et al. Dual neutralization of both interleukin 17A and interleukin 17F with bimekizumab in patients with psoriasis: Results from BE ABLE 1, a 12-week randomized, double-blinded, placebo-controlled phase 2b trial. *J Am Acad Dermatol*. agosto de 2018;79(2):277-286.e10.
116. Reich K, Papp KA, Blauvelt A, Tying SK, Sinclair R, Thaçi D, et al. Tildrakizumab versus placebo or etanercept for chronic plaque psoriasis (reSURFACE 1 and reSURFACE 2): results from two randomised controlled, phase 3 trials. *Lancet*. julio de 2017;390(10091):276-88.
117. Desmyter A, Spinelli S, Boutton C, Saunders M, Blachetot C, de Haard H, et al. Neutralization of Human Interleukin 23 by Multivalent Nanobodies Explained by the Structure of Cytokine–Nanobody Complex. *Front Immunol*. 21 de agosto de 2017;8.
118. Svecova D, Lubell MW, Casset-Semanaz F, Mackenzie H, Grenningloh R, Krueger JG. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 1 study of multiple ascending doses of subcutaneous M1095, an anti–interleukin 17A/F nanobody, in moderate-to-severe psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. julio de 2019;81(1):196-203.
119. McInnes IB, Mease PJ, Ritchlin CT, Rahman P, Gottlieb AB, Kirkham B, et al. Secukinumab sustains improvement in signs and symptoms of psoriatic arthritis: 2 year results from the phase 3 FUTURE 2 study. *Rheumatol (United Kingdom)*. 2017;56(11):1993-2003.
120. Nash P, McInnes IB, Mease PJ, Thom H, Hunger M, Karabis A, et al. Secukinumab Versus Adalimumab for Psoriatic Arthritis: Comparative Effectiveness up to 48 Weeks Using a Matching-

- Adjusted Indirect Comparison. *Rheumatol Ther.* junio de 2018;5(1):99-122.
121. Mease PJ, van der Heijde D, Ritchlin CT, Okada M, Cuchacovich RS, Shuler CL, et al. Ixekizumab, an interleukin-17A specific monoclonal antibody, for the treatment of biologic-naïve patients with active psoriatic arthritis: results from the 24-week randomised, double-blind, placebo-controlled and active (adalimumab)-controlled period of t. *Ann Rheum Dis.* enero de 2017;76(1):79-87.
 122. Mease PJ, Genovese MC, Greenwald MW, Ritchlin CT, Beaulieu AD, Deodhar A, et al. Brodalumab, an Anti-IL17RA Monoclonal Antibody, in Psoriatic Arthritis. *N Engl J Med.* 12 de junio de 2014;370(24):2295-306.
 123. Ritchlin C, Rahman P, Kavanaugh A, McInnes IB, Puig L, Li S, et al. Efficacy and safety of the anti-IL-12/23 p40 monoclonal antibody, ustekinumab, in patients with active psoriatic arthritis despite conventional non-biological and biological anti-tumour necrosis factor therapy: 6-month and 1-year results of the phase 3, m. *Ann Rheum Dis.* junio de 2014;73(6):990-9.
 124. Deodhar A, Gottlieb AB, Boehncke W-H, Dong B, Wang Y, Zhuang Y, et al. Efficacy and safety of guselkumab in patients with active psoriatic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet.* junio de 2018;391(10136):2213-24.
 125. Mens LJJ, Sande MGH, Menegatti S, Chen S, Blijdorp ICJ, Jong HM, et al. Brief Report: Interleukin-17 Blockade With Secukinumab in Peripheral Spondyloarthritis Impacts Synovial Immunopathology Without Compromising Systemic Immune Responses. *Arthritis Rheumatol.* 17 de diciembre de 2018;70(12):1994-2002.
 126. Wendling D, Verhoeven F, Prati C. Anti-IL-17 monoclonal antibodies for the treatment of ankylosing spondylitis. *Expert*

Opin Biol Ther. 2019;19(1):55-64.

127. Sieper J, Poddubnyy D, Miossec P. The IL-23–IL-17 pathway as a therapeutic target in axial spondyloarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2019;15(12):747-57.
128. Genovese MC, Durez P, Richards HB, Supronik J, Dokoupilova E, Aelion JA, et al. One-year Efficacy and Safety Results of Secukinumab in Patients With Rheumatoid Arthritis: Phase II, Dose-finding, Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Study. *J Rheumatol.* marzo de 2014;41(3):414-21.
129. Blanco FJ, Möricke R, Dokoupilova E, Coddling C, Neal J, Andersson M, et al. Secukinumab in Active Rheumatoid Arthritis: A Phase III Randomized, Double-Blind, Active Comparator– and Placebo-Controlled Study. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(6):1144-53.
130. Genovese MC, Greenwald M, Cho C-S, Berman A, Jin L, Cameron GS, et al. A Phase II Randomized Study of Subcutaneous Ixekizumab, an Anti-Interleukin-17 Monoclonal Antibody, in Rheumatoid Arthritis Patients Who Were Naive to Biologic Agents or Had an Inadequate Response to Tumor Necrosis Factor Inhibitors. *Arthritis Rheumatol.* julio de 2014;66(7):1693-704.
131. Genovese MC, Braun DK, Erickson JS, Berclaz PY, Banerjee S, Heffernan MP, et al. Safety and efficacy of open-label subcutaneous ixekizumab treatment for 48 weeks in a phase II study in biologic-naive and TNF-IR patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2016;43(2):289-97.
132. Pavelka K, Chon Y, Newmark R, Lin S-L, Baumgartner S, Erondü N. A Study to Evaluate the Safety, Tolerability, and Efficacy of Brodalumab in Subjects with Rheumatoid Arthritis and an Inadequate Response to Methotrexate. *J Rheumatol.* junio de 2015;42(6):912-9.
133. Kunwar S, Dahal K, Sharma S. Anti-IL-17 therapy in treatment

- of rheumatoid arthritis: a systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Rheumatol Int.* 2016;36(8):1065-75.
134. Beringer A, Miossec P. Systemic effects of IL-17 in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 21 de agosto de 2019;15(8):491-501.
 135. Luchtman DW, Ellwardt E, Larochelle C, Zipp F. IL-17 and related cytokines involved in the pathology and immunotherapy of multiple sclerosis: Current and future developments. *Cytokine Growth Factor Rev.* agosto de 2014;25(4):403-13.
 136. Havrdová E, Belova A, Goloborodko A, Tisserant A, Wright A, Wallstroem E, et al. Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study. *J Neurol.* 3 de julio de 2016;263(7):1287-95.
 137. Hueber W, Sands BE, Lewitzky S, Vandemeulebroecke M, Reinisch W, Higgins PDR, et al. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut.* diciembre de 2012;61(12):1693-700.
 138. Targan SR, Feagan B, Vermeire S, Panaccione R, Melmed GY, Landers C, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Study of Brodalumab in Patients With Moderate-to-Severe Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol.* noviembre de 2016;111(11):1599-607.
 139. Mease P, Roussou E, Burmester G-R, Goupille P, Gottlieb A, Moriarty SR, et al. Safety of Ixekizumab in Patients With Psoriatic Arthritis: Results From a Pooled Analysis of Three Clinical Trials. *Arthritis Care Res (Hoboken).* marzo de 2019;71(3):367-78.

140. van de Kerkhof PCM, Griffiths CEM, Reich K, Leonardi CL, Blauvelt A, Tsai T-F, et al. Secukinumab long-term safety experience: A pooled analysis of 10 phase II and III clinical studies in patients with moderate to severe plaque psoriasis. *J Am Acad Dermatol*. julio de 2016;75(1):83-98.e4.
141. Papp KA, Bachelez H, Blauvelt A, Winthrop KL, Romiti R, Ohtsuki M, et al. Infections from seven clinical trials of ixekizumab, an anti-interleukin-17A monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe psoriasis. *Br J Dermatol*. diciembre de 2017;177(6):1537-51.
142. Danesh MJ, Kimball AB. Brodalumab and suicidal ideation in the context of a recent economic crisis in the United States. *J Am Acad Dermatol*. enero de 2016;74(1):190-2.
143. Lebwohl MG, Papp KA, Marangell LB, Koo J, Blauvelt A, Gooderham M, et al. Psychiatric adverse events during treatment with brodalumab: Analysis of psoriasis clinical trials. *J Am Acad Dermatol*. enero de 2018;78(1):81-89.e5.
144. Lockwood SJ, Prens LM, Kimball AB. Adverse Reactions to Biologics in Psoriasis. *Curr Probl Dermatology*. 2017;53:1-14.
145. Gniadecki R, Bang B, Bryld LE, Iversen L, Lasthein S, Skov L. Comparison of long-term drug survival and safety of biologic agents in patients with psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol*. 2015;172(1):244-52.
146. Belinchón I, Ramos JM, Carretero G, Ferrándiz C, Rivera R, Daudén E, et al. Adverse events associated with discontinuation of the biologics/classic systemic treatments for moderate-to-severe plaque psoriasis: data from the Spanish Biologics Registry, Biobadaderm. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. octubre de 2017;31(10):1700-8.
147. Boehncke WH, Brembilla NC. Immunogenicity of biologic therapies: causes and consequences. *Expert Rev Clin Immunol*. 2018;14(6):513-23.

148. Egeberg A, Ottosen MB, Gniadecki R, Broesby-Olsen S, Dam TN, Bryld LE, et al. Safety, efficacy and drug survival of biologics and biosimilars for moderate-to-severe plaque psoriasis. *Br J Dermatol*. febrero de 2018;178(2):509-19.
149. Roda G, Jharap B, Neeraj N, Colombel JF. Loss of Response to Anti-TNFs: Definition, Epidemiology, and Management. *Clin Transl Gastroenterol*. 2016;7(1):e135-5.
150. Levin EC, Gupta R, Brown G, Malakouti M, Koo J. Biologic fatigue in psoriasis. *J Dermatolog Treat*. 2014;25(1):78-82.
151. Esposito M, Gisondi P, Cassano N, Ferrucci G, Del Giglio M, Loconsole F, et al. Survival rate of antitumour necrosis factor- α treatments for psoriasis in routine dermatological practice: a multicentre observational study. *Br J Dermatol*. septiembre de 2013;169(3):666-72.
152. Arkin MR, Tang Y, Wells JA. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: Progressing toward the reality. *Chem Biol [Internet]*. 2014;21(9):1102-14.
153. Ran X, Gestwicki JE. Inhibitors of protein-protein interactions (PPIs): an analysis of scaffold choices and buried surface area. *Curr Opin Chem Biol [Internet]*. 2018;44:75-86.
154. Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov [Internet]*. septiembre de 2002;1(9):727-30.
155. Sheng C, Dong G, Miao Z, Zhang W, Wang W. State-of-the-art strategies for targeting protein-protein interactions by small-molecule inhibitors. *Chem Soc Rev [Internet]*. 2015;44(22):8238-59.
156. Scott DE, Bayly AR, Abell C, Skidmore J. Small molecules, big targets: drug discovery faces the protein-protein interaction challenge. *Nat Rev Drug Discov [Internet]*. 2016;15(8):533-50.
157. Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ. Hot spots-A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins Struct Funct Bioinforma [Internet]*. 1 de

junio de 2007;68(4):803-12.

158. Sarkar S, Gulati K, Kairamkonda M, Mishra A, Poluri KM. Elucidating Protein-protein Interactions Through Computational Approaches and Designing Small Molecule Inhibitors Against them for Various Diseases. *Curr Top Med Chem*. 2018;18(20):1719-36.
159. Hughes JP, Rees SS, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol*. 2011;162(6):1239-49.
160. Keseru GM, Makara GM. Hit discovery and hit-to-lead approaches. *Drug Discov Today*. 2006;11(15-16):741-8.
161. Rognan D. Rational design of protein-protein interaction inhibitors. *Medchemcomm* [Internet]. 2015;6(1):51-60.
162. Dougherty PG, Qian Z, Pei D. Macrocycles as protein-protein interaction inhibitors. *Biochem J*. 2017;474(7):1109-25.
163. Villar EA, Beglov D, Chennamadhavuni S, Porco JA, Kozakov D, Vajda S, et al. How proteins bind macrocycles. *Nat Chem Biol* [Internet]. 20 de septiembre de 2014;10(9):723-31.
164. Smith G. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* (80-) [Internet]. 14 de junio de 1985;228(4705):1315-7.
165. Gartner ZJ. DNA-Templated Organic Synthesis and Selection of a Library of Macrocycles. *Science* (80-) [Internet]. 10 de septiembre de 2004;305(5690):1601-5.
166. Lerner RA, Neri D. Reflections on DNA-encoded chemical libraries. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2020;527(3):757—759.
167. Meng X, Zhang L, Wei H, Li F, Hu L, Ma H, et al. Optimized methods for IL-17A refolding and anti-IL17A Fab production for co-crystallization with small molecules. *Biotechniques* [Internet]. 27 de abril de 2020;69:btn-2019-0170.
168. Schreiber SL. Target-Oriented and Diversity-Oriented Organic

- Synthesis in Drug Discovery. Science (80-) [Internet]. 17 de marzo de 2000;287(5460):1964-9.
169. Gerry CJ, Wawer MJ, Clemons PA, Schreiber SL. DNA Barcoding a Complete Matrix of Stereoisomeric Small Molecules. J Am Chem Soc [Internet]. 3 de julio de 2019;141(26):10225-35.
170. Ting JP, Tung F, Antonysamy S, Wasserman S, Jones SB, Zhang FF, et al. Utilization of peptide phage display to investigate hotspots on IL-17A and what it means for drug discovery. PLoS One [Internet]. 2018;13(1):1-18.
171. Espada A, Broughton H, Jones S, Chalmers MJ, Dodge JA. A Binding Site on IL-17A for Inhibitory Macrocycles Revealed by Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. J Med Chem. 2016;59(5):2255-60.
172. Liu S, Desharnais J, Sahasrabudhe P V, Jin P, Li W, Oates BD, et al. Inhibiting complex IL-17A and IL-17RA interactions with a linear peptide. Sci Rep [Internet]. 2016;6:26071.
173. Liu S, Dakin LA, Xing L, Withka JM, Sahasrabudhe P V., Li W, et al. Binding site elucidation and structure guided design of macrocyclic IL-17A antagonists. Sci Rep [Internet]. 16 de agosto de 2016;6(1):30859.
174. Wang W, Groves MR, Dömling A. Artificial macrocycles as IL-17A/IL-17RA antagonists. Medchemcomm. 2018;9(1):22-6.
175. Deodhar A, Mease PJ, McInnes IB, Baraliakos X, Reich K, Blauvelt A, et al. Long-term safety of secukinumab in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: Integrated pooled clinical trial and post-marketing surveillance data. Arthritis Res Ther. 2019;21(1):1-11.
176. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol. julio de 1977;36(1):59-74.

177. Martínez-Maqueda D, Miralles B, Recio I. HT29 Cell Line. En: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editores. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 113-24.
178. Lee JW, Wang P, Kattah MG, Youssef S, Steinman L, DeFea K, et al. Differential Regulation of Chemokines by IL-17 in Colonic Epithelial Cells. *J Immunol*. 2008;181(27):6536-45.
179. Micallef L, Belaubre F, Pinon A, Jayat-Vignoles C, Delage C, Charveron M, et al. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2009;18(2):143-51.
180. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* [Internet]. 1 de marzo de 1988 [citado 26 de septiembre de 2019];106(3):761-71.
181. Brennecke P, Rasina D, Aubi O, Herzog K, Landskron J, Cautain B, et al. EU-OPENSREEN: A Novel Collaborative Approach to Facilitate Chemical Biology. *SLAS Discov Adv Sci Drug Discov* [Internet]. 7 de marzo de 2019;24(3):398-413.
182. Trott O, Olson AJ. Software news and update AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 30 de enero de 2010;31(2):455-61.
183. Schröder R, Schmidt J, Blättermann S, Peters L, Janssen N, Grundmann M, et al. Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells. *Nat Protoc*. 2011;6(11):1748-60.
184. Du Y, Xu J, Fu H, Xu AS. Label-Free Biosensor Technologies in

- Small Molecule Modulator Discovery. En: Fu H, editor. Chemical Genomics [Internet]. Cambridge: Cambridge University Press; 2012. p. 245-58.
185. Morgan H, Burroughs S, Butler P, Park-Bewsher J, Cloutier T. Sensitive protein:ligand biochemical assays using Corning® Epic® label-free technology on the EnSpire Multimode Plate Reader. PerkinElmer Appl. 2011;
 186. Czajkowsky DM, Hu J, Shao Z, Pleass RJ. Fc-fusion proteins: New developments and future perspectives. EMBO Mol Med. 2012;4(10):1015-28.
 187. Welch NG, Scoble JA, Muir BW, Pigram PJ. Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays (Review). Biointerphases [Internet]. 2017;12(2):02D301.
 188. Zhang, Chung, Oldenburg. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. J Biomol Screen. 1999;4(2):67-73.
 189. Sui Y, Wu Z. Alternative statistical parameter for high-throughput screening assay quality assessment. J Biomol Screen. 2007;12(2):229-34.
 190. Malo N, Hanley JA, Cerquozzi S, Pelletier J, Nadon R. Statistical practice in high-throughput screening data analysis. Nat Biotechnol. 2006;24(2):167-75.
 191. Iversen PW, Beck B, Chen Y, Dere W, Devanarayan V, Eastwood BJ, et al. HTS Assay Validation 2 . Stability and Process Studies. En: Assay Guidance Manual. 2012.
 192. Tudos A. Introduction to surface plasmon resonance. En: Handbook of surface Plasmon resonance [Internet]. 2008. p. 1-14.
 193. Olaru A, Bala C, Jaffrezic-Renault N, Aboul-Enein HY. Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors in Pharmaceutical Analysis. Crit Rev Anal Chem. 2015;45(2):97-105.

194. Wartchow CA, Podlaski F, Li S, Rowan K, Zhang X, Mark D, et al. Biosensor-based small molecule fragment screening with biolayer interferometry. *J Comput Aided Mol Des*. 2011;25(7):669-76.
195. Lin A, Salvador A, Carter MJ. Multiplexed Microsphere Suspension Array-Based Immunoassays. En: *ELISA: Methods and Protocols*. 2015. p. 1-216.
196. Stewart A, Banerji U. Utilizing the Luminex Magnetic Bead-Based Suspension Array for Rapid Multiplexed Phosphoprotein Quantification. En: *Kinase Signaling Networks*. 2017. p. 235-51.
197. Tang H, Panemangalore R, Yarde M, Zhang L, Cvijic ME. 384-Well Multiplexed Luminex Cytokine Assays for Lead Optimization. *J Biomol Screen*. 2016;21(6):548-55.
198. Liu L, Lu J, Allan BW, Tang Y, Tetreault J, Chow CK, et al. Generation and characterization of ixekizumab, a humanized monoclonal antibody that neutralizes interleukin-17A. *J Inflamm Res*. 2016;9:39-50.
199. Silacci M, Lembke W, Woods R, Attinger-Toller I, Baenziger-Tobler N, Batey S, et al. Discovery and characterization of COVA322, a clinical-stage bispecific TNF/IL-17A inhibitor for the treatment of inflammatory diseases. *MAbs*. 2016;8(1):141-9.
200. Friedrich M, Diegelmann J, Schaubert J, Auernhammer CJ, Brand S. Intestinal neuroendocrine cells and goblet cells are mediators of IL-17A-amplified epithelial IL-17C production in human inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* [Internet]. 2014;8(October):1-16.
201. Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, et al. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med* [Internet]. 2009;206(3):525-34.

202. Wang Y-L, Fang M, Wang X-M, Liu W-Y, Zheng Y-J, Wu X-B, et al. Proinflammatory effects and molecular mechanisms of interleukin-17 in intestinal epithelial cell line HT-29. *World J Gastroenterol* [Internet]. 21 de diciembre de 2014;20(47):17924-31.
203. Olaru F, Jensen LE. Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors. Vol. 19, *Experimental Dermatology*. 2010. p. 314-6.
204. Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y, et al. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2017;2017:1-12.
205. Soboleva AG, Zolotarev AD, Sobolev V V, Bruskin SA, Piruzian ES, Mezentsev A V. Genetically predetermined limitation in HaCaT cells that affects their ability to serve as an experimental model of psoriasis. *Russ J Genet*. 2014;50(10):1081-9.
206. Cho KA, Kim JY, Woo SY, Park HJ, Lee KH, Pae CU. Interleukin-17 and interleukin-22 induced proinflammatory cytokine production in keratinocytes via inhibitor of nuclear factor- κ B kinase- α expression. *Ann Dermatol*. 2012;24(4):398-405.
207. Cho KA, Suh JW, Ho Lee K, Kang JL, Woo SY. IL-17 and IL-22 enhance skin inflammation by stimulating the secretion of IL-1 β by keratinocytes via the ROS-NLRP3-caspase-1 pathway. *Int Immunol*. 2012;24(3):147-58.
208. Chiricozzi A, Guttman-Yassky E, Suárez-Farías M, Nogales KE, Tian S, Cardinale I, et al. Integrative responses to IL-17 and TNF- α in human keratinocytes account for key inflammatory pathogenic circuits in psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2011;131(3):677-87.

209. Harper EG, Guo C, Rizzo H, Lillis J V., Kurtz SE, Skorcheva I, et al. Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: Implications for psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2009;129(9):2175-83.
210. Wu N, Huang D, Tsou H, Lin Y, Lin W. Syk Mediates IL-17-Induced CCL20 Expression by Targeting Act1-Dependent K63-Linked Ubiquitination of TRAF6. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2015;135(2):490-8.
211. Bocheńska K, Smolińska E, Moskot M, Jakóbkiewicz-Banecka J, Gabig-Cimińska M. Models in the Research Process of Psoriasis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 24 de noviembre de 2017;18(12):2514.
212. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8.
213. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1559-82.
214. Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(13):2657-60.
215. Kutyavin I V., Lukhtanov EA, Gamper HB, Meyer RB. Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: Base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(18):3718-23.
216. Laborda J. 36B4 cDNA used as an estradiol-independent mRNA control is the cDNA for human acidic ribosomal phosphoprotein P0. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(14):3998.
217. Akamine R, Yamamoto T, Watanabe M, Yamazaki N, Kataoka M, Ishikawa M citoquinas R.-S pdf., et al. Usefulness of the 5' region of the cDNA encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0 conserved among rats, mice, and humans as a standard

- probe for gene expression analysis in different tissues and animal species. *J Biochem Biophys Methods*. 2007;70(3):481-6.
218. Sbidian E, Chaimani A, Garcia-Doval I, Do G, Hua C, Mazaud C, et al. Systemic pharmacological treatments for chronic plaque psoriasis: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 22 de diciembre de 2017;(12).
 219. Sánchez Martínez I, Cerdán Sánchez M, López Román J, Iniesta Martínez F, Carreón-Guarnizo E, Meca Lallana JE, et al. Possible Influence of the Route of Treatment Administration on Treatment Adherence in Patients With Multiple Sclerosis. *Clin Ther*. 2020;42(5):87-99.
 220. Zimmermann G, Neri D. DNA-encoded chemical libraries: foundations and applications in lead discovery. *Drug Discov Today* [Internet]. 2016;21(11):1828-34.
 221. Arkin MR, Wells J a. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(4):301-17.
 222. Johnson DK, Karanicolas J. Druggable Protein Interaction Sites Are More Predisposed to Surface Pocket Formation than the Rest of the Protein Surface. Briggs JM, editor. *PLoS Comput Biol* [Internet]. 7 de marzo de 2013;9(3):e1002951.
 223. Rao VS, Srinivas K, Sujini GN, Kumar GNS. Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *Int J Proteomics* [Internet]. 2014;2014:1-12.
 224. Winter A, Higuieruelo AP, Marsh M, Sigurdardottir A, Pitt WR, Blundell TL. Biophysical and computational fragment-based approaches to targeting protein-protein interactions: applications in structure-guided drug discovery. *Q Rev Biophys* [Internet]. 13 de noviembre de 2012;45(4):383-426.
 225. Pantsar T, Poso A. Binding Affinity via Docking: Fact and Fiction. *Molecules* [Internet]. 30 de julio de 2018;23(8):1DUMMY.

226. Grundmann M. Label-free dynamic mass redistribution and bio-impedance methods for drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol* [Internet]. 22 de junio de 2017 [citado 10 de noviembre de 2017];2017:9.24.1-9.24.21.
227. Janzen WP. Screening technologies for small molecule discovery: The state of the art. *Chem Biol* [Internet]. 2014;21(9):1162-70.
228. Franke FC, Müller J, Abal M, Medina ED, Nitsche U, Weidmann H, et al. The Tumor Suppressor SASH1 Interacts With the Signal Adaptor CRKL to Inhibit Epithelial–Mesenchymal Transition and Metastasis in Colorectal Cancer. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2019;7(1):33-53.
229. Akhter S, Chakraborty S, Moutinho D, Álvarez-Coiradas E, Rosa I, Viñuela J, et al. The human VGF-derived bioactive peptide TLQP-21 binds heat shock 71 kDa protein 8 (HSPA8) on the surface of SH-SY5Y cells. *PLoS One* [Internet]. 21 de septiembre de 2017;12(9):1-19.
230. Ely LK, Fischer S, Garcia KC. Structural basis of receptor sharing by interleukin 17 cytokines. *Nat Immunol* [Internet]. 2009;10(12):1245-51.
231. Leeson PD, Springthorpe B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(11):881-90.
232. Claesson A, Spjuth O. On Mechanisms of Reactive Metabolite Formation from Drugs. *Mini-Reviews Med Chem* [Internet]. 1 de marzo de 2013;13(5):720-9.
233. Dang N Le, Hughes TB, Miller GP, Swamidass SJ. Computational Approach to Structural Alerts: Furans, Phenols, Nitroaromatics, and Thiophenes. *Chem Res Toxicol*. 2017;30(4):1046-59.
234. Kalgutkar AS, Didiuk MT. Structural alerts, reactive metabolites, and protein covalent binding: How reliable are

- these attributes as predictors of drug toxicity? *Chem Biodivers*. 2009;6(11):2115-37.
235. Guo X, Jiang X, Xiao Y, Zhou T, Guo Y, Wang R, et al. IL-17A signaling in colonic epithelial cells inhibits pro-inflammatory cytokine production by enhancing the activity of ERK and PI3K. *PLoS One*. 2014;9(2).
 236. de Jong EMGJ, van Vlijmen IMMJ, van Erp PEJ, Ramaekers FCS, Troyanovski SM, van de Kerkhof PCM. Keratin 17: a useful marker in anti-psoriatic therapies. *Arch Dermatol Res* [Internet]. octubre de 1991;283(7):480-2.
 237. LEIGH IM, NAVSARIA H, PURKIS PE, MCKAY IA, BOWDEN PE, RIDDLE PN. Keratins (Kl6 and Kl7) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro. *Br J Dermatol* [Internet]. octubre de 1995;133(4):501-11.
 238. Fu M, Wang G. Keratin 17 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis. *J Dermatol Sci* [Internet]. septiembre de 2012;67(3):161-5.
 239. DePianto D, Kerns ML, Dlugosz AA, Coulombe PA. Keratin 17 promotes epithelial proliferation and tumor growth by polarizing the immune response in skin. *Nat Genet* [Internet]. 26 de octubre de 2010;42(10):910-4.
 240. Shi X, Jin L, Dang E, Chang T, Feng Z, Liu Y, et al. IL-17A upregulates keratin 17 expression in keratinocytes through STAT1-and STAT3-dependent mechanisms. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2011;131(12):2401-8.
 241. Zhang W, Dang E, Shi X, Jin L, Feng Z, Hu L, et al. The pro-inflammatory cytokine il-22 up-regulates keratin 17 expression in keratinocytes via stat3 and erk1/2. *PLoS One*. 2012;7(7):3-10.
 242. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suárez-Fariñas M, Cardinale I, et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory

- and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* [Internet]. agosto de 2008.
243. Desmet E, Ramadhas A, Lambert J, Van Gele M. In vitro psoriasis models with focus on reconstructed skin models as promising tools in psoriasis research. *Exp Biol Med*. 1 de junio de 2017;242(11):1158-69.
244. Seo MD, Kang TJ, Lee CH, Lee AY, Noh M. HaCa T keratinocytes and primary epidermal keratinocytes have different transcriptional profiles of cornified envelope-associated genes to T helper cell cytokines. *Biomol Ther*. 2012;20(2):171-6.
245. Kirkham BW, Kavanaugh A, Reich K. Interleukin-17A: A unique pathway in immune-mediated diseases: Psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Immunology*. 2014;141(2):133-42.
246. Griffin GK, Newton G, Tarrio ML, Bu D, Maganto-Garcia E, Azcutia V, et al. IL-17 and TNF- α Sustain Neutrophil Recruitment during Inflammation through Synergistic Effects on Endothelial Activation. *J Immunol*. 2012;188(12):6287-99.
247. Beringer A, Thiam N, Molle J, Bartosch B, Miossec P. Synergistic effect of interleukin-17 and tumour necrosis factor- α on inflammatory response in hepatocytes through interleukin-6-dependent and independent pathways. *Clin Exp Immunol*. 2018;193(2):221-33.
248. Noack M, Beringer A, Miossec P. Additive or Synergistic Interactions Between IL-17A or IL-17F and TNF or IL-1 β Depend on the Cell Type. *Front Immunol*. 2019;10(July):1726.
249. Shen F, Hu Z, Goswami J, Gaffen SL. Identification of common transcriptional regulatory elements in interleukin-17 target genes. *J Biol Chem*. 2006;281(34):24138-48.
250. Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Fariñas MS, Fuentes-Duculan J, et al. Amelioration of

- epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med*. 2007;204(13):3183-94.
251. Chabaud M, Page G, Miossec P. Enhancing Effect of IL-1, IL-17, and TNF- α on Macrophage Inflammatory Protein-3 α Production in Rheumatoid Arthritis: Regulation by Soluble Receptors and Th2 Cytokines. *J Immunol*. 2001;167(10):6015-20.
 252. Lin C, He H, Liu H, Li R, Chen Y, Qi Y, et al. Tumour-associated macrophages-derived CXCL8 determines immune evasion through autonomous PD-L1 expression in gastric cancer. *Gut* [Internet]. octubre de 2019;68(10):1764-73.
 253. Zhang L, Kang Y, Chen S, Wang L, Jiang M, Xiang L. Circulating CCL20: A potential biomarker for active vitiligo together with the number of Th1/17 cells. *J Dermatol Sci* [Internet]. 2019;93(2):92-100.
 254. Awane M, Andres PG, Li DJ, Reinecker HC. NF- κ B-inducing kinase is a common mediator of IL-17-, TNF- α -, and IL-1 β -induced chemokine promoter activation in intestinal epithelial cells. *J Immunol*. 1999;162:5337-44.
 255. S nder SU, Saret S, Tang W, Sturdevant DE, Porcella SF, Siebenlist U. IL-17-induced NF- κ B Activation via CIKS/Act1. *J Biol Chem* [Internet]. 15 de abril de 2011;286(15):12881-90. Disponible en: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M110.199547>
 256. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 1 de octubre de 2009;1(4):a000034-a000034.
 257. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 14 de diciembre de 2017;2(1):17023.
 258. Tergaonkar V, Bottero V, Ikawa M, Li Q, Verma IM. I κ B Kinase-Independent I κ B α Degradation Pathway: Functional

- NF- κ B Activity and Implications for Cancer Therapy. *Mol Cell Biol.* 2003;23(22):8070-83.
259. Shen F, Li N, Gade P, Kalvakolanu D V, Weibley T, Doble B, et al. IL-17 receptor signaling inhibits C/EBP β by sequential phosphorylation of the regulatory 2 domain. *Sci Signal.* febrero de 2009;2(59):ra8.
260. Somma D, Mastrovito P, Grieco M, Lavorgna A, Pignalosa A, Formisano L, et al. CIKS/DDX3X Interaction Controls the Stability of the Zc3h12a mRNA Induced by IL-17 . *J Immunol.* 2015;194(7):3286-94.



Declaración de conflicto de interés

La autora declara que no existe ningún tipo de conflicto de interés en relación con la presente tesis doctoral.

En Santiago de Compostela, 2 de septiembre de 2020

Fdo.

Elia Álvarez Coiradas

